

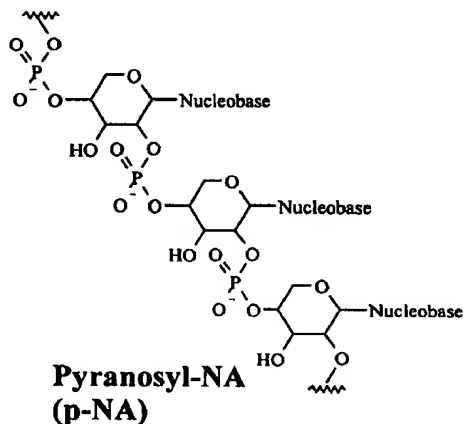
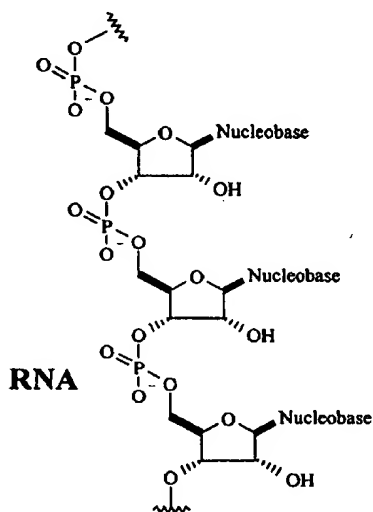
PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation ⁶: C07H 13/04, A61K 31/70	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/15542 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 1. April 1999 (01.04.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06000 (22) Internationales Anmeldedatum: 21. September 1998 (21.09.98) (30) Prioritätsdaten: 197 41 738.8 22. September 1997 (22.09.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO. KG [DE/DE]; Patent- und Lizenzabteilung, Gebäude K801, D-65926 Frankfurt am Main (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MICULKA, Christian [AT/DE]; Gebeschusstrasse 36, D-65929 Frankfurt am Main (DE). WINDHAB, Norbert [DE/DE]; Akazienstrasse 28, D-65795 Hattersheim am Main (DE). BRANDSTETTER, Tilmann [DE/DE]; Johannesallee 41, D-65929 Frankfurt am Main (DE). SCHERER, Stefan [DE/DE]; Lerchenweg 5, D-64572 Büttelborn (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, JP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>

(54) Title: LINKER NUCLEOSIDE, AND PRODUCTION AND USE OF THE SAME

(54) Bezeichnung: LINKER-NUCLEOSID, SEINE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG



(57) Abstract

The invention relates to a linker nucleoside, to the production of said linker nucleoside and to its use for covalently bonding biomolecules to oligonucleotides, especially p-RNA oligonucleotides.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Linker-Nucleosid, seine Herstellung und Verwendung zur kovalenten Bindung von Biomolekülen an Oligonucleotide, insbesondere p-RNA-Oligonucleotide.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Linker-Nucleosid, seine Herstellung und Verwendung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Linker-Nucleosid, seine Herstellung und Verwendung zur kovalenten Bindung von Biomolekülen an Oligonucleotide, insbesondere p-RNA-Oligonucleotide.

Pyranosyl-Nucleinsäuren (p-NA's) sind im allgemeinen zur natürlichen RNA isomere Strukturtypen, bei denen die Pentose-Einheiten in der Pyranoseform vorliegen und durch Phosphodiestergruppen zwischen den Positionen C-2' und C-4' repetitiv verknüpft sind (Fig. 1). Unter "Nucleobase" werden dabei die kanonischen Nucleobasen A, T, U, C, G, aber auch die Paare Isoguanin/Isocytosin und 2,6-Diaminopurin/Xanthin und im Sinne der vorliegenden Erfindung auch andere Purine und Pyrimidine verstanden. p-NA's, und zwar die von der Ribose abgeleitete p-RNA's, wurden zum erstenmal von Eschenmoser et al. beschrieben (Pitsch, S. et al. Helv. Chim. Acta 1993, 76, 2161; Pitsch, S. et al. Helv. Chim Acta 1995, 78, 1621; Angew. Chem. 1996, 108, 1619-1623). Sie bilden ausschließlich sogenannte Watson-Crick-gepaarte, d. h. Purin-Pyrimidin- und Purin-Purin-gepaarte, antiparallele, reversibel „schmelzende“, quasi-lineare und stabile Duplices. Homochirale p-RNA-Stränge entgegengesetzten Chiralitätssinns paaren ebenfalls kontrollierbar und sind in der gebildeten Duplex streng nicht-helical. Diese für den Aufbau supramolekularer Einheiten wertvolle Spezifität hängt mit der relativ geringen Flexibilität des Ribopyranosephosphat-Rückgrats sowie mit der starken Neigung der Basenebene zur Strangachse und der hieraus folgenden Tendenz zu intercatenarer Basenstapelung im resultierenden Duplex zusammen und läßt sich letztlich auf die Teilnahme eines 2',4'-cis-disubstituierten Ribopyranoserings am Aufbau des Rückgrates zurückführen. Diese wesentlich besseren Paarungseigenschaften machen p-NA's gegenüber DNA und RNA für die Anwendung des Aufbaus supramolekularer Einheiten zu bevorzugten Paarungssystemen. Sie bilden ein zu natürlichen Nucleinsäuren orthogonales Paarungssystem, d. h. sie paaren nicht mit in der natürlich Form vorkommenden DNA's und RNA's, was im besonderen im diagnostischen Bereich von Bedeutung ist.

Eschenmoser et al. (1993, supra) hat zum ersten Mal eine p-RNA, wie in Fig. 2 dargestellt und nachstehend erläutert, hergestellt.

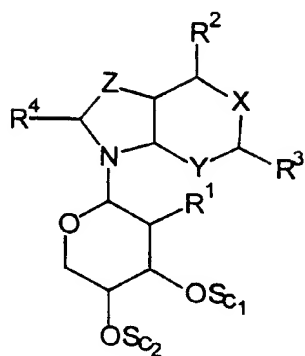
Hierbei wurde eine geeignete geschützte Nucleobase mit dem Anomerengemisch der Tetra-
benzoyl-Ribopyranose durch Einwirken von Bis(trimethylsilyl)acetamid und einer Lewis-
Säure wie z. B. Trimethylsilyl-trifluormethansulfonat zur Reaktion gebracht (analog H. Vor-
brüggen, K. Krolkiewicz, B. Bennua, Chem. Ber. 1981, 114, 1234.). Unter Baseneinwirkung
(NaOH in THF/Methanol/Wasser im Falle der Purine; gesättigter Ammoniak in MeOH im
Falle der Pyrimidine) wurden die Acylschutzgruppen vom Zucker abgespalten, und das Pro-
dukt unter saurer Katalyse mit p-Anisaldehyddimethylacetal in 3',4'-Position geschützt. Das
Diastereomerengemisch wurde in 2'-Stellung acyliert, das 3',4'-methoxybenzylidengeschützte
2'-Benzoat durch saure Behandlung, z. B. mit Trifluoressigsäure in Methanol deacetalisiert,
und mit Dimethoxytritylchlorid umgesetzt. Die 2'→3'-Wanderung des Benzoats wurde durch
Behandlung mit p-Nitrophenol/4-(Dimethylamino)pyridin/Triethylamin/Pyridin/n-Propanol
eingeleitet. Fast alle Reaktionen wurden durch Säulenchromatographie aufgearbeitet. Der so
synthetisierte Schlüsselbaustein, das 4'-DMT-3'-benzoyl-1'-Nucleobasen-Derivat der Ribopy-
ranose, wurde dann zum Teil phosphityliert bzw. über einen Linker an eine feste Phase ge-
bunden.

Bei der anschließenden automatisierten Oligonucleotidsynthese wurde die trägergebundene
Komponente in 4'-Position wiederholt sauer entschützt, ein Phosphoramidit unter Einwirkung
eines Kupplungsreagenz, z. B. ein Tetrazolderivat, angekuppelt, noch freie 4'-Sauerstoffatome
acetyliert und das Phosphoratom oxidiert, um so das oligomere Produkt zu erhalten. An-
schließend wurden die restlichen Schutzgruppen abgespalten, das Produkt über HPLC gerei-
nigt und entsalzt.

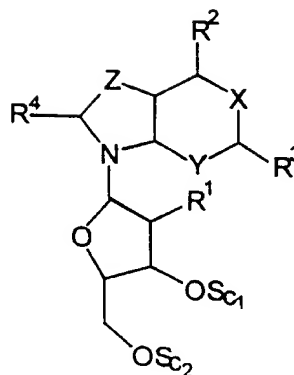
Nachteil des bereits bekannten p-RNA Oligonucleotide ist, daß keine Methoden bekannt sind,
andere Biomoleküle an diese Oligonucleotide kovalent zu binden.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, geeignete Konstrukte bereitzustellen, die
eine kovalente Bindung anderer Biomoleküle an Oligonucleotide, insbesondere an p-RNA-
Oligonucleotide ermöglichen.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Linker-Nucleosid der Formel (I) oder (II),



(I)

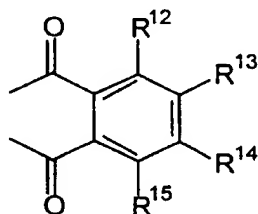


(II)

5

worin

- 10 R^1 gleich H, OH, Hal mit Hal gleich vorzugsweise Br oder Cl.
 R^2 , R^3 und R^4 unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils OC_nH_{2n-1} oder $(C_nH_{2n})NR^{10}R^{11}$ mit $R^{10}R^{11}$ verbunden über einen Rest der Formel



(V),

- 15 worin R^{12} , R^{13} , R^{14} und R^{15} unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils H, C_nH_{2n+1} oder C_nH_{2n-1} , mit n gleich eine ganze Zahl von 1-12, vorzugsweise 1-8, insbesondere 1-4, oder OR^7 , wobei R^7 gleich H, C_nH_{2n+1} oder C_nH_{2n-1} , wobei n die oben genannte Bedeutung

hat, $-C(O)R^8$ mit R^8 gleich ein linearer oder verzweigter, gegebenenfalls substituierter Alkyl-, Aryl-, vorzugsweise Phenyl-Rest,

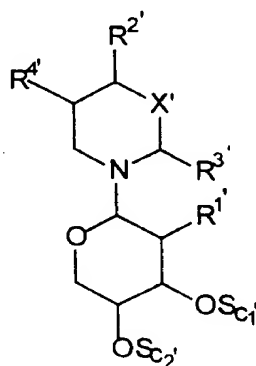
X, Y und Z unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils $=N-$, $=C(R^9)-$ oder $-N(R^9)-$ mit R^9 und R^9 unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils H oder

5 C_nH_{2n+1} oder $(C_nH_{2n})NR^{10}R^{11}$ mit den oben genannten Bedeutungen, bedeutet, und

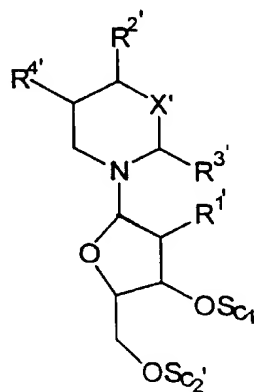
S_{c1} und S_{c2} unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils H oder eine Schutzgruppe ausgewählt aus einer Acyl-, Trityl- oder Allyloxycarbonylgruppe, vorzugsweise eine Benzoyl- oder 4, 4'-Dimethoxytrityl-(DMT-)gruppe, oder ein Phosphoester(III), Phosphoester(V), Thiophosphat(V), Phosphonat oder Phosphoramidit,

10

oder der Formel (III) oder (IV)



(III)



(IV)

15 worin $R^{1'}$ gleich H, OH oder Hal mit Hal gleich vorzugsweise Br oder Cl,

$R^{2'}$, $R^{3'}$ und $R^{4'}$ unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils OC_nH_{2n+1} oder $(C_nH_{2n})NR^{10'}R^{11'}$, wobei $R^{10'}$, $R^{11'}$, unabhängig voneinander die oben genannte Bedeutung von R^{10} bzw. R^{11} hat, und

X' , Y' und Z' unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils $=N-$, $=C(R^9)-$ oder $-$

20 $N(R^9)-$ bedeutet, wobei R^9 und R^9 unabhängig voneinander die oben genannte Bedeutung von R^9 bzw. R^9 haben, und $S_{c1'}$ bzw. $S_{c2'}$ die oben genannte Bedeutung von S_{c1} bzw. S_{c2} haben.

Die erfindungsgemäße Pentose ist im allgemeinen ein Ribose, Arabinose, Lyxose und/oder Xylose, vorzugsweise eine Ribopyranose, wobei der Pentopyranosyl-Teil D-konfiguriert, aber auch L-konfiguriert sein kann.

5 Üblicherweise handelt es sich bei dem erfindungsgemäßen Linker-Nucleosid um ein Pentopyranosyl-, bzw. Pentofuranosyl-purin, -2,6-diaminopurin, -6-purinthiol, -pyridin, -pyrimidin, -adenosin, -guanosin, -isoguanosin, -6-thioguanosin, -xanthin, -hypoxanthin, -thymidin, -cytosin, -isocytosin, -indol, -tryptamin, -N-phthaloyltryptamin, -uracil, -coffein, -theobromin, -theophyllin, -benzotriazol oder -acridin, insbesondere um ein Pentopyranosyl-purin, -pyrimidin, -adenosin, -guanosin, -thymidin, -cytosin, tryptamin, -N-phthalotryptamin oder -uracil.

Die erfindungsgemäßen Linker-Nucleoside sind folglich Verbindungen mit funktionellen Gruppen, die kovalent Biomoleküle, an z. B. in ihrer natürlichen Form vorkommende oder
15 modifizierte Nucleinsäuren, wie DNA, RNA aber auch p-NA's, vorzugsweise pRNA's, binden können. Für p-NA's ist dies besonders vorteilhaft, da hier noch keine Linker bekannt sind.

Beispielsweise fallen hierunter Pentopyranosyl-Nucleoside, bei denen R^2 , R^3 , R^4 , R^2' , R^3' und/oder R^4' ein 2-Phthalimidoethyl- oder Allyloxy-Rest bedeutet. Bevorzugt sind gemäß der
20 vorliegenden Erfindung beispielsweise Uracil-basierende Linker, bei denen vorzugsweise die 5-Position des Uracils modifiziert wurde, z. B. N-Phthaloylaminoethyluracil, aber auch Indol-basierende Linker, vorzugsweise Tryptaminderivate, wie z. B. N-Phthaloyltryptamin.

In einer besonderen Ausführungsform wird beispielsweise ein Linker gemäß Formel (III) oder
25 (IV), worin $R^{4'} (C_nH_{2n})NR^{10'}R^{11'}$ bedeutet und $R^{10'}R^{11'}$ über einen Rest der Formel (V) mit der bereits bezeichneten Bedeutung verbunden ist, durch folgendes Verfahren auf vorteilhafte Weise hergestellt:

(a) eine Verbindung der Formel (III) oder (IV) mit $R^{4'}$ gleich $(C_nH_{2n})OS_{e3}$ oder $(C_nH_{2n})Hal$,
worin n die oben genannte Bedeutung hat, S_{e3} eine Schutzgruppe, vorzugsweise eine Mesylat-
30 Gruppe, und Hal Chlor oder Brom bedeutet, wird mit einem Azid, vorzugsweise in DMF, umgesetzt, anschließend wird

(b) das Reaktionsprodukt aus (a), vorzugsweise mit Triphenylphosphin z. B. in Pyridin reduziert, dann

- (c) das Reaktionsprodukt aus (b) mit einem entsprechenden Phthalimid, z. B. N-Ethoxycarbonylphthalimid, umgesetzt, und
- (d) das Reaktionsprodukt aus (c) mit einer entsprechenden geschützten Pentose, z. B. Ribose-tetrabenzoat, umgesetzt, und schließlich
- 5 (e) werden gegebenenfalls die Schutzgruppen, z. B. mit Methylat, abgespalten, und dann gegebenenfalls in einen für die Oligonucleotidsynthese geeigneten phosphorylierten Baustein überführt.

Daneben weisen Indolderivate als Linker den Vorzug der Fluoreszenzfähigkeit auf und sind daher für Nanotechnologie-Anwendungen, bei denen es ggf. um den Nachweis kleinster Substanzmengen geht, besonders bevorzugt. So wurden Indol-1-riboside bei N. N. Suvorov et al., Biol. Aktivn. Soedin., Akad. Nauk SSSR 1965, 60 und Tetrahedron 1967, 23, 4653 bereits beschrieben. Allerdings gibt es kein analoges Verfahren, 3-substituierte Derivate herzustellen. Im allgemeinen erfolgt ihre Herstellung über die Bildung eines Amins der ungeschützten Zuckerkomponente und einem Indolin, welches dann durch Oxidation in das Indol-1-ribosid übergeführt wird. Beschrieben wurden z. B. Indol-1-glucoside und -1-araboside (Y. V. Dobriynin et al, Khim.-Farm. Zh. 1978, 12, 33), deren 3-substituierte Derivate meist über Vielsmeier-Reaktion hergestellt wurden. Dieser Weg der Einführung von Aminoethyl-Einheiten in 3-Position des Indols ist für eine industrielle Anwendung jedoch zu aufwendig.

20 In einer weiteren besonderen Ausführungsform wird daher beispielsweise ein Linker gemäß Formel (I) oder (II), worin X und Y unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils $=C(R^{16})$ mit R^{16} gleich H oder C_nH_{2n} und $Z = C(R^{16})-$ mit R^{16} gleich $(C_nH_{2n})NR^{10}R^{11}$ durch folgendes Verfahren auf vorteilhafte Weise hergestellt:

- 25 (a) das entsprechende Indolin, z. B. N-Phthaloyltryptamin, wird mit einer Pentose, z. B. D-Ribopyranose, zum Nucleosidtriol umgesetzt, dann werden
- (b) die Hydroxylgruppen des Pentose-Teils des Produktes aus (a) vorzugsweise mit Acylgruppen, z. B. mittels Essigsäureanhydrid, geschützt, anschließend wird
- (c) das Produkt aus (b), z. B. durch 2,3-Dichlor-5,6-dicyanoparachinon, oxidiert, und
- 30 (d) gegebenenfalls werden die Hydroxyl-Schutzgruppen des Pentose-Teils des Produktes aus (c) z. B. mittels Methylat abgespalten, und dann gegebenenfalls in einen für die Oligonucleotidsynthese geeigneten phosphorylierten Baustein überführt.

Die beschriebenen Verfahren lassen sich jedoch nicht nur bei Ribopyranosen anwenden, sondern auch bei Ribofuranosen und 2'-Deoxyribofuranosen bzw. 2'-Deoxyribopyranosen, was besonders vorteilhaft ist. Als Nucleosidierungspartner der Zucker wird vorzugsweise Tryptamin, insbesondere N-Acylderivate des Tryptamins, vor allem N-Phthaloyltryptamin verwendet. Die restlichen Linker-Nucleoside lassen sich in analoger oder dem Fachmann bekannten Weise herstellen.

In einer weiteren Ausführungsform werden die 4'- geschützten, vorzugsweise, die 3', 4'- geschützten Linker-Nucleoside in einem weiteren Schritt phosphityliert oder an eine feste Phase gebunden.

Die Phosphitylierung erfolgt beispielsweise durch Phosphorigsäuremonoallylester-diisopropyl-amidchlorid in Anwesenheit einer Base, z. B. N-Ethyl-diisopropylamin oder durch Phosphortrichlorid und Imidazol bzw. Tetrazol und nachfolgender Hydrolyse unter Basenzusatz. Im ersten Fall ist das Produkt ein Phosphoramidit und im zweiten Fall ein H-Phosphonat. Die Bindung eines geschützten erfindungsgemäßen Pentopyranosyl-Nucleosids an eine feste Phase, z. B. „long-chain-alkylamino-controlled pore glass“ (CPG, Sigma Chemie, München) kann beispielsweise wie bei Eschenmoser et al. (1993) beschrieben erfolgen.

Die erhaltenen Verbindungen dienen z. B. für die Herstellung von Pentopyranosyl-Nucleinsäuren, die einen der erfindungsgemäßen Linker enthalten.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Herstellung einer Nucleinsäure, mit folgenden Schritten:

- (a) in einem ersten Schritt wird ein geschütztes Nucleosid oder ein geschütztes Linker-Nucleosid an eine feste Phase gebunden wird und
- (b) in einem zweiten Schritt wird das gemäß Schritt (a) an eine feste Phase gebundene 3'-, 4'-geschützte Nucleosid um ein phosphityliertes 3'-, 4'-geschütztes Nucleosid bzw. Linker-Nucleosid verlängert, anschließend z. B. durch eine wäßrige Jodlösung oxidiert, und
- (c) Schritt (b) solange mit gleichen oder unterschiedlichen Nucleosiden bzw. Linker-Nucleosiden wiederholt, bis die gewünschte Nucleinsäure vorliegt, wobei die Nucleinsäure mindestens ein erfinderisches Linker-Nucleosid enthält.

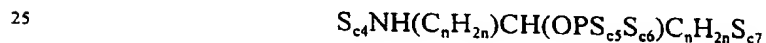
Als Kupplungsreagenz bei Einsatz von Phosphoramiditen eignen sich saure Aktivatoren wie Pyridinium-Hydrochlorid, besonders Benzimidazoliumtriflat, vorzugsweise nach Umkristallisieren in Acetonitril und nach Lösen in Acetonitril, da im Gegensatz zu 5-(4-Nitrophenyl)-1H-tetrazol als Kupplungsreagenz keine Verstopfung der Kupplungsreagenz-Leitungen und eine
 5 Verunreinigung des Produktes erfolgt.

Als Kupplungsreagenz beim Einsatz von H-Phosphonaten eignen sich besonders Arylsulfonylchloride, Diphenylchlorophosphat, Pivaloylchlorid oder Adamantoylchlorid.

10 Weiterhin ist es vorteilhaft durch Zusatz von einem Salz, wie Natriumchlorid, zur schutzgruppenabspaltenden Hydrazinolyse von Oligonukleotiden, insbesondere von p-NA's, vorzugsweise von p-RNA's, Pyrimidinbasen, vor allem Uracil und Thymin, vor einer Ringöffnung zu schützen, die das Oligonukleotid zerstören würde. Allyloxygruppen können vorzugsweise durch Palladium [Pd(O)]-Komplexe z.B. vor der Hydrazinolyse abgespalten werden.

15 In einer weiteren besonderen Ausführungsform können in Schritt (a) und/oder Schritt (b) auch Pentofuranosyl-nucleoside, z. B. das in ihrer natürlichen Form vorkommende Adenosin, Guanosin, Cytidin, Thymidin und/oder Uracil, neben Pentopyranosyl-nucleosiden eingebaut werden, was z. B. zu einer gemischten p-NA-DNA bzw. p-NA-RNA führt.

20 In einer anderen besonderen Ausführungsform kann in einem weiteren Schritt ein Allyloxy-Linker der Formel



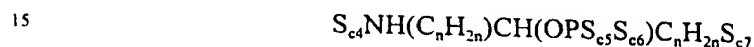
(IV),

worin S_{c4} und S_{c7} unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils eine Schutzgruppe insbesondere ausgewählt aus Fmoc und/oder DMT,

30 S_{c5} und S_{c6} unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils eine Allyloxy- und/oder Diisopropylamino-Gruppe bedeuten, eingebaut werden. n hat die bereits oben genannte Bedeutung.

Ausgehend von z. B. Lysin können somit in wenigen Reaktionsschritten amino-terminale Linker aufgebaut werden, die sowohl eine aktivierbare Phosphorverbindung als auch eine säurelabile Schutzgruppe, wie DMT, tragen und daher leicht in der automatisierbaren Oligonucleotidsynthese verwendet werden können (siehe z. B. P. S. Nelson et al., Nucleic Acid Res. 1989, 17, 7179; L. J. Arnold et al., WO 8902439). Das Repertoire wurde in der vorliegenden Erfindung durch einen Lysin-basierender Linker erweitert, bei dem anstelle der sonst üblichen Cyanoethyl-Gruppe am Phosphoratom eine Allyloxy-Gruppe eingebracht wurde, und welcher daher in vorteilhafter Weise in der Noyori-Oligonucleotid-Methode eingesetzt werden kann (R. Noyori, J. Am. Chem. Soc. 1990, 112, 1691-6).

Die vorliegende Erfindung erstreckt sich daher auch auf einen Allyloxy-Linker der Formel



(IV),

worin S_{c4} und S_{c7} unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils eine Schutzgruppe insbesondere ausgewählt aus Fmoc und/oder DMT, S_{c5} und S_{c6} unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils eine Allyloxy- und/oder Diisopropylamino-Gruppe und n wie oben bezeichnet, bedeuten.

Ein besonders bevorzugter Allyloxy-Linker ist (2-(S)-N-Fmoc-O¹-DMT-O²-allyloxydiisopropylaminophosphinyl-6-amino-1,2-hexandiol).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch eine Nucleinsäure, die mindestens ein erfindungsgemäßes Linker-Nucleosid und gegebenenfalls mindestens einen erfindungsgemäßen Allyloxy-Linker enthält. Besonders bevorzugt ist eine Pentopyranosyl-Nucleinsäure, da p-NA's und insbesondere die p-RNA's untereinander stabile Duplices bilden und im allgemeinen nicht mit den in ihrer natürlichen Form vorkommenden DNA's und RNA's paaren. Diese Eigenschaft macht p-NA's zu bevorzugten Paarungssystemen.

Solche Paarungssysteme sind supramolekulare Systeme nicht kovalenter Wechselwirkung, die sich durch Selektivität, Stabilität und Reversibilität auszeichnen, und deren Eigenschaften bevorzugt thermodynamisch, d. h. durch Temperatur, pH-Wert und Konzentration beeinflusst werden. Solche Paarungssysteme können z. B. aufgrund ihrer selektiven Eigenschaften auch
5 als „molekularer Klebstoff“ für die Zusammenführung von unterschiedlichen Metallclustern zu Cluster-Verbänden mit potentiell neuen Eigenschaften verwendet werden [siehe z. B. R. L. Letsinger, et al., Nature 1996, 382, 607-9; P. G. Schultz et al., Nature 1996, 382, 609-11]. Folglich eignen sich die p-NA's auch für die Anwendung im Bereich der Nanotechnologie, beispielsweise zur Herstellung neuer Materialien, Diagnostika und Therapeutika sowie mikro-
10 elektronischer, photonischer bzw. optoelektronischer Bauteile und für das kontrollierte Zusammenführen molekularer Species zu supramolekularen Einheiten, wie z. B. für den (kombinatorischen) Aufbau von Proteinasssemblies [siehe z. B. A. Lombardi, J. W. Bryson, W. F. DeGrado, Biopolymers (Pept. Sci.) 1997, 40, 495-504], da p-NA's Paarungssysteme bilden, die stark und thermodynamisch kontrollierbar sind. Eine weitere Anwendung ergibt sich daher
15 gerade im diagnostischen und drug discovery-Bereich durch die Möglichkeit, funktionelle, bevorzugt biologische Einheiten wie Proteine oder DNA/RNA-Abschnitte, mit einem p-NA-Code zu versehen, der nicht mit den natürlichen Nucleinsäuren interferiert (siehe z. B. WO93/20242).

20 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Konjugat enthaltend ein erfindungsgemäßes Linker-Nucleosid bzw. eine erfinderische Nucleinsäure und ein Biomolekül.

Unter Biomolekül versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung z. B. ein Peptid oder Protein, wie z. B. einen Rezeptor, einen Antikörper oder funktionelle Teile davon oder ein Enzym, sowie eine Nucleinsäure wie DNA oder RNA, oder Zellbestandteile wie Lipide, Glykoproteine, Filamentbestandteile, oder Viren, Virenbestandteile wie Kapside, Viroide, und deren
25 Derivate wie z. B. Acetate. Funktionelle Teile von Antikörper sind beispielsweise Fv-Fragmente (Skerra & Plückthun (1988) Science 240, 1038), einzelkettige Fv-Fragmente (scFv; Bird et al (1988), Science 242, 423; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,
30 85, 5879) oder Fab-Fragmente (Better et al. (1988) Science 240, 1041).

Die erfindungsgemäßen Konjugate aus Effektormolekülen und bevorzugt peptidischen, aber im Gegensatz zu PNA selektiven und kontrollierbaren Paarungssystemen sind dann vorteil-

haft, wenn reversibel supramolekulare *assemblies* aufgebaut werden sollen, deren Wirkung, wie z. B. Bindung, Inhibition, Auslösung eines physiologischen Effektes, sich von der Wirkung der einzelnen Effektormoleküle unterscheidet.

- 5 Ein Ansatz, peptidische „Klebe“-Einheiten zur Bildung von homo- oder heterodimeren *assemblies* zu verwenden, wird z. B. in WO 94/28173 beschrieben:

Assoziierungspeptide (Hexa- oder Heptapeptide) einer festgelegten Sequenz führen Effektoreinheiten, wie z. B. Proteine, zu supramolekularen Einheiten zusammen. Höhere Flexibilität kann eine solchen Methode durch Steuerbarkeit dieses Assoziierungsvorganges erhalten, die im allgemeinen mit den Assoziierungspeptiden nicht realisiert werden kann, in vorteilhafter Weise jedoch mit den Paarungssystemen der vorliegenden Erfindung.

So beschreibt z. B. WO 96/13613 eine Methode zum Auffinden einer Substanz, die eine biologische Wirkung durch die Multimerisierung von Proteinen auslöst, indem man zuerst eine Substanz I durch einen Test ermittelt, die an ein Protein bindet, dann eine zweite Substanz II ermittelt, die an ein zweites Protein bindet und dann die beiden Substanzen I und II kovalent über einen Linker verbindet, so daß eine Dimerisierung der beiden Proteine ausgelöst wird. Diese Dimerisierung führt dann den gewünschten biologischen Effekt herbei. Größere Flexibilität kann eine solche Methode erhalten, wenn das Verbinden der beiden Substanzen I und II nicht kovalent, sondern durch ein Paarungssystem wie das erfindungsgemäße Oligomer oder Konjugat erfolgt. Durch die Steuerbarkeit dieser Paarung, beispielsweise durch Temperatur oder pH, kann der Dimerisierungsvorgang der Proteine beobachtet oder dessen Ausmaß gesteuert werden. Die erfindungsgemäßen Paarungssysteme haben z. B. gegenüber den Systemen aus WO 96/13522 den Vorteil, daß sie Nuclease-stabil sind.

Ein Biomolekül, z. B. DNA oder RNA, kann zum nicht-kovalenten Verbinden (Linken) mit einem anderen Biomolekül, z. B. DNA oder RNA, verwendet werden, wenn beide Biomoleküle Abschnitte enthalten, die aufgrund komplementärer Sequenzen von Nucleobasen durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken aneinander binden können. Derartige Biomoleküle finden z. B. in analytischen Systemen zur Signalamplifizierung Verwendung, wo ein in seiner Sequenz zu analysierendes DNA-Molekül über einen solchen nicht-kovalenten DNA-Linker zum einen an einen festen Träger immobilisiert, und zum anderen an ein signalverstärkendes

branchedDNA-Molekül (bDNA) gebunden werden soll (siehe z. B. S. Urdea, Bio/Technol. 1994, 12, 926 oder US-Patent Nr. 5,624,802). Ein wesentlicher Nachteil der zuletzt beschriebenen Systeme ist, daß sie den Verfahren zur Nucleinsäure-Diagnostik durch Polymerase-Chain-Reaction (PCR) (K. Mullis, Methods Enzymol. 1987, 155, 335) hinsichtlich der Emp-
5 findlichkeit bis jetzt unterlegen sind. Das ist u. a. darauf zurückzuführen, daß die nicht-kovalente Bindung vom festen Träger an das zu analysierende DNA-Molekül ebenso wie die nicht-kovalente Bindung des zu analysierenden DNA-Moleküls nicht immer spezifisch erfolgt, wodurch es zu einer Vermischung der Funktionen „Sequenzerkennung“ und „nicht-kovalente Bindung“ kommt. Die Verwendung von p-NA's als orthogonales Paarungssystem,
10 welches nicht in das DNA- bzw. RNA-Paarungsgeschehen eingreift, löst dieses Problem auf vorteilhafte Weise, wodurch die Empfindlichkeit der beschriebenen analytischen Verfahren deutlich erhöht werden kann.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich dabei um p-RNA/DNA- bzw. p-
15 RNA/RNA-Konjugate.

Konjugate werden dann vorzugsweise verwendet, wenn die Funktionen „Sequenzerkennung“ und „nicht-kovalente Bindung“ in einem Molekül realisiert werden müssen, da die erfindungsgemäßen Konjugate zwei zueinander orthogonale Paarungssysteme enthalten.
20

Für die Herstellung von Konjugaten sind sowohl sequentielle als auch konvergente Verfahren geeignet.

In einem sequentiellen Verfahren wird z. B. nach erfolgter automatisierter Synthese eines p-
25 RNA-Oligomeren direkt am gleichen Synthesizer - nach Umstellung der Reagenzien und des Kupplungsprotokolls - z. B. ein DNA-Oligonukleotid weitersynthetisiert. Dieser Vorgang läßt sich auch in umgekehrter Reihenfolge durchführen.

In einem konvergenten Verfahren werden z. B. p-RNA-Oligomere mit Aminoterminalen-
30 Linkern und z. B. DNA-Oligomere mit z. B. Thiol-Linkern in getrennten Vorgängen synthetisiert. Anschließend erfolgt vorzugsweise eine Jodacetylierung des p-RNA-Oligomeren und die Kupplung der beiden Einheiten nach literaturbekannten Protokollen (T. Zhu et al., Bioconjug. Chem. 1994, 5, 312).

Konvergente Verfahren erweisen sich aufgrund ihrer Flexibilität als besonders bevorzugt.

Unter dem Begriff Konjugat im Sinne der vorliegenden Erfindung sind auch sogenannte
5 Arrays zu verstehen. Arrays sind Anordnungen von immobilisierten Erkennungsspecies, die
speziell in der Analytik und Diagnostik eine wichtige Rolle bei der simultanen Bestimmung
von Analyten spielen. Beispiele sind Peptide-Arrays (Fodor et al., Nature 1993, 364, 555) und
Nucleinsäure-Arrays (Southern et al. Genomics 1992, 13, 1008; Heller, US-Patent Nr.
5,632,957). Eine höhere Flexibilität dieser Arrays kann dadurch erreicht werden, daß die Er-
10 kennungsspecies an codierende Oligonucleotide gebunden werden und die zugehörigen, kom-
plementären Stränge an bestimmte Positionen auf einem festen Träger. Durch Aufbringen der
codierten Erkennungsspecies auf den „anti-codierten“ festen Träger und Einstellung von Hy-
bridisierungsbedingungen werden die Erkennungsspecies an den gewünschten Positionen
nicht-kovalent gebunden. Dadurch können verschiedene Typen von Erkennungsspecies, wie z.
15 B. DNA-Abschnitte, Antikörper, nur durch Anwendung von Hybridisierungsbedingungen
gleichzeitig auf einem festen Träger angeordnet werden (siehe Fig. 4.). Voraussetzung hierzu
sind aber äußerst starke, selektive - um die codierenden Abschnitte möglichst kurz zu halten -
und mit natürlicher Nucleinsäure nicht interferierender Codons und Anticodons notwendig. p-
NA's, vorzugsweise p-RNA's eignen sich hierzu in besonders vorteilhafter Weise.

20 Unter dem Begriff „Träger“ versteht man im Sinne der vorliegenden Erfindung Material, ins-
besondere Chipmaterial, das in fester oder auch gelartiger Form vorliegt. Als Trägermateriali-
en eignen sich beispielsweise Keramik, Metall, insbesondere Edelmetall, Gläser, Kunststoffe,
kristalline Materialien bzw. dünne Schichten des Trägers, insbesondere der genannten Mate-
25 rialien, oder (bio)molekulare Filamente wie Cellulose, Gerüstproteine.

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Träger, an den mindestens
ein erfindungsgemäßes Linker-Nucleosid, mindestens eine erfindungsgemäße Nucleinsäure
und/oder mindestens ein erfindungsgemäßes Konjugat immobilisiert ist.

30 Unter dem Begriff „immobilisiert“ versteht man im Sinne der vorliegenden Erfindung die
Ausbildung einer kovalenten Bindung, quasi-kovalenten Bindung oder supramolekularen
Bindung durch Assoziation von zwei oder mehreren molekularen Spezies wie linear konsti-

5 tuierte Moleküle, insbesondere Peptide, Peptoide, Proteine, lineare Oligo- oder Polysaccharide, Nukleinsäuren und deren Analoga, oder Monomere wie Heterocyclen, insbesondere Stickstoffheterocyclen, oder nichtlinear konstituierte Moleküle wie verzweigte Oligo- oder Polysaccharide oder Antikörper und deren funktionelle Teile wie Fv-Fragmente, einzelkettige Fv-Fragmente (scFv) oder Fab-Fragmente.

Als Trägermaterialien eignen sich beispielsweise Keramik, Metall, insbesondere Edelmetall, Gläser, Kunststoffe, kristalline Materialien bzw. dünne Schichten des Trägers, insbesondere der genannten Materialien, oder (bio)molekulare Filamente wie Cellulose, Gerüstproteine.

10

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich auch auf ein Diagnostikum enthaltend ein erfindungsgemäßes Linker-Nucleosid, eine erfindungsgemäße Nucleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Konjugat, wie oben bereits näher beschrieben.

15 Ein anderer Gegenstand der Erfindung ist daher die Verwendung eines erfindungsgemäßen Linker-Nucleosids, einer erfindungsgemäßen Nucleinsäure, eines erfindungsgemäßen Konjugates und/oder eines erfindungsgemäßen Trägers zur Herstellung eines Arzneimittels, wie z. B. eines Therapeutikums, eines Diagnostikums und/oder eines elektronischen Bauteils.

20 Die Erfindung bezieht sich auch auf die Verwendung der erfindungsgemäßen Linker-Nucleoside, der erfindungsgemäßen Nucleinsäure bzw. des erfindungsgemäßen Konjugates und/oder des erfindungsgemäßen Trägers in einem Paarungs- und/oder Testsystem, wie z. B. in WO94/28173, WO96/13522, WO96/13613, R. L. Letsinger, et al., Nature, 1996, 382, 607-9; P. G. Schultz et al., Nature, 1996, 382, 609-11 oder A. Lombardi, J. W. Bryson, W. F. De-
25 Grado, Biopolymers (Pept. Sci.) 1997, 40, 495-504 näher beschrieben und oben allgemein erläutert.

Die folgenden Figuren und Beispiele sollen die Erfindung näher beschreiben, ohne sie zu beschränken.

30

BESCHREIBUNG DER FIGUREN

- Fig. 1 zeigt einen Ausschnitt aus der Struktur von RNA in ihrer natürlich vorkommenden
5 Form (links) und in Form einer p-NA (rechts).
- Fig. 2 zeigt schematisch die Synthese eines p-Ribo(A,U)-Oligonucleotids nach Eschenmoser
et al. (1993).
- 10 Fig. 3 zeigt schematisch eine Anordnung von immobilisierten Erkennungsstrukturen (Arrays)
auf einem festen Träger.

BEISPIELE

Synthese von p-RNA-Linkersystemen

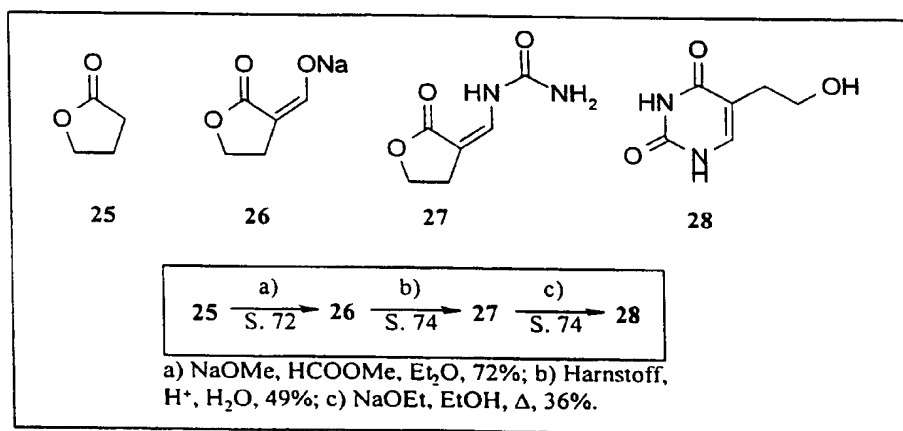
5 Im folgenden werden drei Wege beschrieben, die die Bereitstellung von Linkern, die einen Amino-Terminus aufweisen, der dann zum Anlinken funktioneller Einheiten verwendet werden kann, ermöglichen:

Beispiel 1

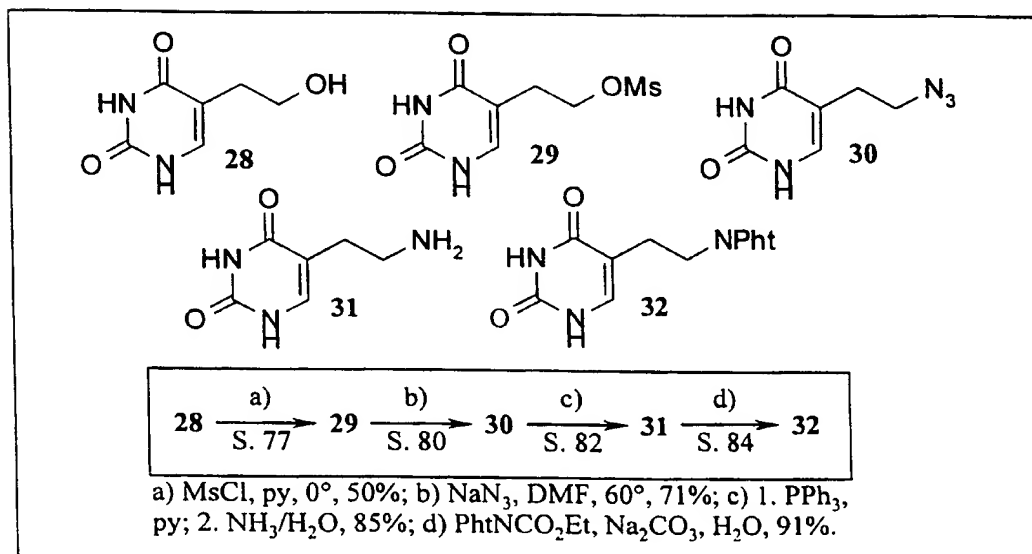
10 Uracil-basierender Linker

auf der Basis der Modifizierung der 5-Position des Uracils.

Die Herstellung von Hydroxyethyluracil **28** gelingt im großen Maßstab nach bekannter Methode (J.D. Fissekis, A. Myles, G.B. Brown, J. Org. Chem. 1964, 29, 2670. g-Butyrolacton **25** wurde mit Ameisensäuremethylester formyliert, das Natriumsalz **26** zum Harnstoffderivat **27** umgesetzt und dieses zum Hydroxyethyluracil **28** cyclisiert (Schema 1).



Schema 1: Synthese von Hydroxyethyluracil 28.

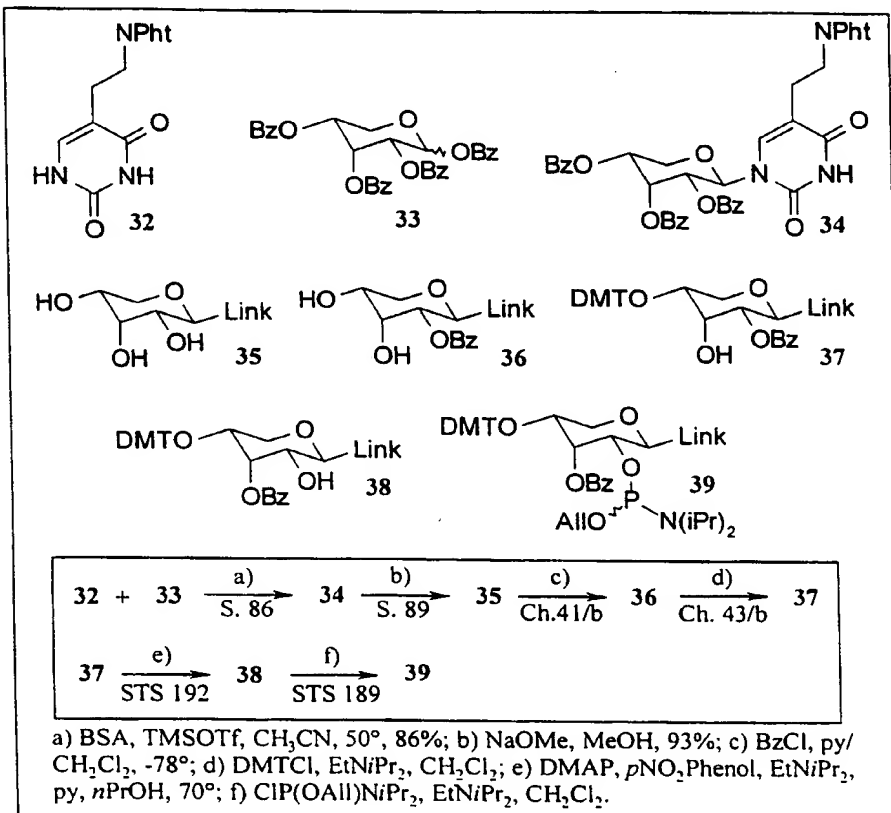


Schema 2: Synthese von N-Phtaloylaminoethyluracil 32.

Hydroxyethyluracil 28 wurde mit Methansulfonsäurechlorid in Pyridin mesyliert zu 29 (J.D. Fissekis, F. Sweet, J. Org. Chem. 1973, 38, 264).

Die folgenden Stufen wurden neu erfunden: Mit Natriumazid in DMF wurde 29 zum Azid 30 umgesetzt und dieses mit Triphenylphosphin in Pyridin zum Aminoethyluracil 31 reduziert. Die Aminofunktion in 31 wurde schließlich mit N-Ethoxycarbonylphtalimid geschützt (Schema 2). Nukleosidierung von Ribosetetrabenzoat 33 mit N-Phtaloylaminoethyluracil 32 lieferte das Ribosetribenzoat 34 in guten Ausbeuten. Das anomere Zentrum des Pyranoserings ist, wie aus der Kopplungskonstanten zwischen H-C(1') und H-C(2') von J = 9.5 Hz klar ersichtlich, β -konfiguriert. Anschließende Abspaltung der Benzoatschutzgruppen mit NaOMe in MeOH lieferte das Linkertriol 35. 35 wurde bei -78°C in Pyridin/Dichlormethan 1:10 in Gegenwart von DMAP mit Benzoylchlorid umgesetzt. Dabei erhielt man neben dem gewünschten 2'-Benzoat 36 (64%) auch 2',4'-dibenzoyliertes Produkt (22%), welches gesammelt und analog der Methanolyse von 34 nach 35 wieder in das Triol 35 umgewandelt wurde. Das 2'-Benzoat 36 wurde mit Dimethoxytritylchlorid in Gegenwart von Hünig-Base in Dichlormethan in 4'-Position in Ausbeuten größer 90% trityliert. Die Umlagerung von 4'-DMT-2'-benzoat 37 zum 4'-DMT-3'-benzoat 38 erfolgte in Gegenwart von DMAP, p-Nitrophenol und Hünig-Base in n-Propanol/Pyridin 5:2. Nach Chromatographie wird 38 erhalten. 4'-DMT-3'-benzoat 38 wurde abschließend mit CIP(OAll)N(iPr)₂ in Gegenwart von Hünig-Base zum

Phosphoramidit **39** umgesetzt (Schema 3). Dieser läßt sich ohne Änderung der Syntheseprotokolle für die automatisierte Oligonucleotidsynthese einsetzen.

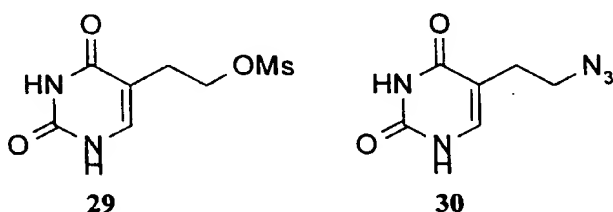


Schema 3: Synthese des Linkerphosphoramidites **39**.

Ausführung:

Synthese eines Uracil-Linker-Bausteins

5-(2-Azidoethyl)uracil (**30**)



1. Durchführung

In einem mit Innenthermometer und Rückflußkühler ausgestatteten 500-ml-Dreihalskolben wurden 26.0 g (0.11 mol) **29** in 250 ml DMF gelöst und mit 10.8 g (0.166 mol) Natriumazid versetzt. Die Suspension wurde im Anschluß vier Stunden bei 60°C gerührt (DC-Kontrolle, CHCl₃/MeOH 9:1). Das DMF wurde abdestilliert und der Rückstand mit 150 ml Wasser verrührt. Der Feststoff wurde abfiltriert, mit ca. 50 ml Wasser gewaschen und über Nacht im Vakuum im Exsiccator über Phosphorpentoxid getrocknet. Man erhielt 14.2 g (71%) **30** in Form eines farblosen Feststoffes vom Schmp. 230-235°C (u. Zers.).

2. Analytische Daten

5-(2-Azidoethyl)uracil (**30**):

Schmp.: 230-235°C u. Zersetz..

DC: CHCl₃/MeOH 9:1, R_f 0.48.

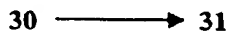
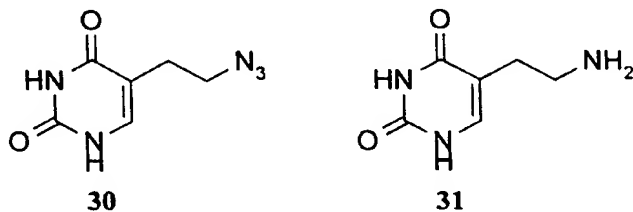
UV (MeOH): λ_{\max} 263.0 (7910).

IR (KBr): 3209s, 3038s, 2139s, 1741s, 1671s, 1452m, 1245m, 1210m.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 2.46 (t, 2H, J(CH₂CH₂N, CH₂CH₂N) = 7.0, CH₂CH₂N); 3.40 (t, 2H, J(CH₂CH₂N, CH₂CH₂N) = 7.0, CH₂CH₂N); 7.36 (s, H-C(6)); 11.00 (br. s, 2H, H-N(1), H-N(3)).

MS (ESI⁺): 180.0 [M+H]⁺.

5-(2-Aminoethyl)uracil (**31**)



1. Durchführung

In einem mit Innenthermometer und Rückflußkühler ausgestatteten 250-ml-Dreihalskolben wurden 14.2 g (78.0 mmol) **30** in 175 ml Pyridin suspendiert und mit 61.4 g (234 mmol) Triphenylphosphin versetzt²⁾. Es wurde fünf Stunden auf 60°C erwärmt und über Nacht bei Raumtemp. gerührt (DC-Kontrolle, CHCl₃/MeOH 5:1). Zur Suspension wurden 40 ml einer 25%igen Ammoniaklösung gegeben, die daraufhin aufklarte. Die Lösungsmittel wurden i.v.i.RV entfernt. Der Rückstand wurde in 200 ml CH₂Cl₂/MeOH 1:1 30 min bei Raumtemp. gerührt, der Niederschlag abfiltriert und mit CH₂Cl₂ gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum im Exsiccator über Phosphorpentoxid erhielt man 10.0 g (85%) **31** vom Schmp. 214-220°C.

2. Analytische Daten

15 5-(2-Aminoethyl)uracil (**31**):

Schmp.: 214-220°C u. Gasentwicklung, vorher sintern.

DC: CHCl₃/MeOH/HOAc/H₂O 85:20:10:2, R_f 0.07.

UV (MeOH): λ_{max} 263.0 (6400).

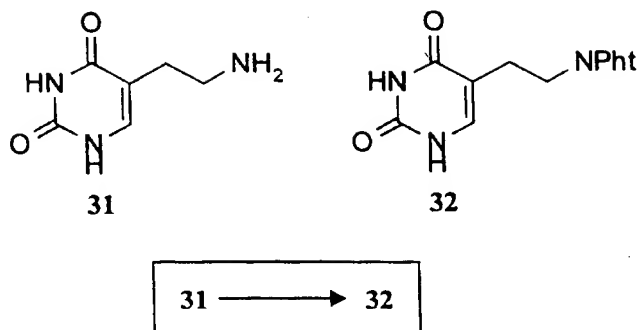
20 **IR** (KBr): 3430m, 3109s, 1628s, 1474m, 1394s, 1270s, 1176w, 1103m, 1021m, 966m, 908m, 838m.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 2.21 (t, 2H, J(CH₂CH₂N, CH₂CH₂N) = 6.8, CH₂CH₂N); 2.59 (t, 2H, J(CH₂CH₂N, CH₂CH₂N) = 6.8, CH₂CH₂N); 5.90 (v. br. s, 4H, H-N(1), H-N(3), NH₂); 7.19 (s, H-C(6)).

MS (ESI): 153.9 [M-H].

25

5-(2-Phtalimidoethyl)uracil (32)



1. Durchführung

- 5 In einem 250-ml-Rundkolben wurden 9.6 g (61.8 mmol) **31** in 100 ml Wasser suspendiert und mit 6.64 g (62.6 mmol) Na_2CO_3 versetzt. Nach 15 min Rühren bei Raumtemp. gab man portionsweise 14.3 g (65 mmol) N-Ethoxycarbonylphtalimid zu und rührte drei Stunden bei Raumtemp. (DC-Kontrolle, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 5:1). Die nunmehr zähe, weiße Suspension wurde vorsichtig¹⁾ mit konz. Salzsäure auf pH 4 eingestellt und der weiße Niederschlag abfiltriert.
- 10 Nach Waschen mit Wasser wurde der Feststoff im Vakuum im Exsiccator über Phosphorpentoxid getrocknet. Dies lieferte 16.0 g (91%) **32** vom Schmp. 324-327°C.

2. Analytische Daten

- 15 5-(2-Phtalimidoethyl)uracil (**32**):

Schmp.: 324-327°C u. Zersetz..

DC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 5:1, R_f 0.51.

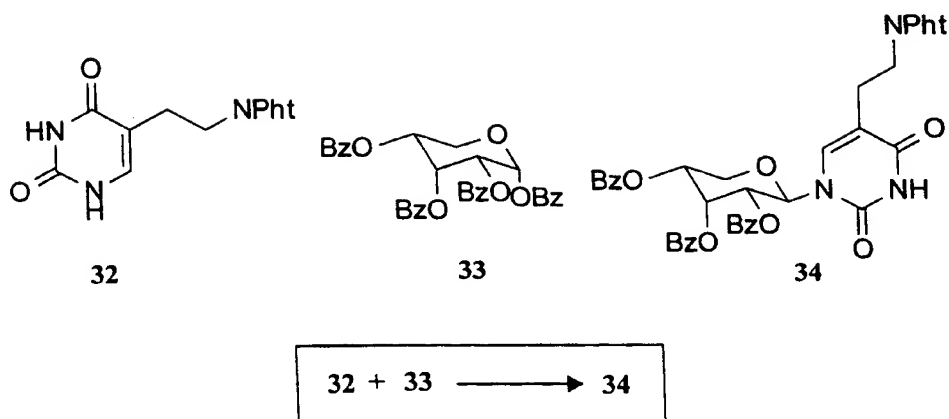
UV (MeOH): λ_{max} 263.0 (5825); λ 298.0 (sh., 1380).

IR (KBr): 3446m, 3216m, 1772m, 1721s, 1707s, 1670s, 1390m.

- 20 **¹H-NMR** (300 MHz, d_6 -DMSO): 2.49 (t, 2H, $J(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}) = 6.0$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 3.71 (t, 2H, $J(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}) = 6.0$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 7.24 (s, H-C(6)); 7.84 (m, 4H, NPh); 10.76 (br. s, H-N(1), H-N(3)).

MS (ESI⁺): 284.0 [M-H].

- 25 **1-(2, 3, 4-Tri-O-benzoyl-β-D-ribosepyranosyl)-5-(2-phtalimido-ethyl)uracil (34)**



1. Durchführung

- 5 In einem 250-ml-Dreihalskolben, ausgestattet mit Argonüberleitung, Innenthermometer und Septum, wurden 7.00 g (24 mmol) 32 und 13.6 g (24 mmol) 33 in 120 ml Acetonitril suspendiert. Dann wurden mittels Spritze zunächst 12.2 ml (50 mmol) BSA zugegeben und nach 30 min Rühren nochmals 7 ml (28 mmol) BSA zugegeben. Nach kurzzeitigem Erwärmen auf 40°C klarte sich die Reaktionsmischung auf. Bei Raumtemp. wurden 13 ml (72 mmol)
- 10 TMSOTf mittels Spritze zugegeben. Nach einer Stunde konnte noch keine Produktbildung beobachtet werden (DC-Kontrolle, AcOEt/n-Heptan 1:1). Daher wurden weitere 13 ml (72 mmol) TMSOTf zugegeben. Im Anschluß wurde der Reaktionsansatz auf 50°C erwärmt. Nach 2.5 h Rühren bei 50°C (DC-Kontrolle) wurde auf RT. gekühlt, auf eine eiskalte Mischung von 250 ml AcOEt und 190 ml ges. NaHCO₃-Lösung und 10 min intensiv ausgerührt.
- 15 Man wusch nochmals mit 100 ml NaHCO₃-Lösung und extrahierte die wäßrigen Phasen nochmals mit 100 ml AcOEt. Die ver. org. Phasen wurden mit MgSO₄ getrocknet und die Lösungsmittel i.V.i.RV entfernt. Nach Trocknen im ÖPV erhielt man 20.9 g Rohprodukt. Chromatographie an Kieselgel (h = 25 cm, κ = 5 cm, AcOEt/n-Heptan 1:1) lieferte ein DC-einheitliches, schaumiges Produkt, das mit Et₂O digeriert wurde. Filtration und Trocknen im
- 20 ÖPV ergab 15 g (86%) 34.

2. Analytische Daten

1-(2,3,4-Tri-O-benzoyl-β-D-ribofuranosyl)-5-(2-phthalimidoethyl)uracil (34):

25 **Schmp.:** 124°C (sintern).

DC: AcOEt/n-Heptan 1:1, R_f 0.09.

UV (MeOH): λ_{\max} 263.0 (11085); λ 299.0 (sh., 1530).

IR (KBr): 3238w, 3067w, 1772m, 1710s, 1452m, 1395m, 1266s, 1110s, 1070m, 1026m.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 2.79 (m_e , 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 3.96 (m_e , 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 4.06 (dd, $J(\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(5'), \text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(5')) = 11.0$, $J(\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(5'), \text{H-C}(4')) = 6.0$, $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(5')$); 4.12 (t, $J(\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(5'), \text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(5')) = J(\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(5'), \text{H-C}(4')) = 11.0$, $\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(5')$); 5.39 (dd, $J(\text{H-C}(2'), \text{H-C}(1')) = 9.5$, $J(\text{H-C}(2'), \text{H-C}(3')) = 2.9$, $\text{H-C}(2')$); 5.46 (ddd, $J(\text{H-C}(4'), \text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(5')) = 11.0$, $J(\text{H-C}(4'), \text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(5')) = 6.0$, $J(\text{H-C}(4'), \text{H-C}(3')) = 2.9$, $\text{H-C}(4')$); 6.26 (ψt , $J \approx 2.6$, $\text{H-C}(3')$); 6.36 (d, $J(\text{H-C}(1'), \text{H-C}(2')) = 9.5$, $\text{H-C}(1')$); 7.24-7.40, 7.44-7.56, 7.61-7.66, 7.72-7.80, 7.84-7.90, 8.06-8.13 (6m, 16H, 3 Ph, $\text{H-C}(6)$); 7.70, 7.82 (2 m_e , 4H, NPht); 8.37 (s, $\text{H-N}(3)$).

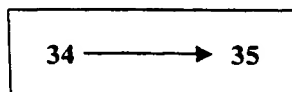
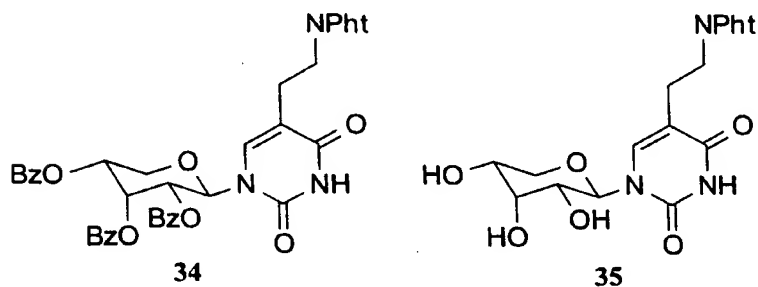
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): 21.19 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 36.33 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 64.07 ($\text{C}(5')$); 66.81, 68.22 ($\text{C}(4')$, $\text{C}(2')$); 69.29 ($\text{C}(3')$); 78.59 ($\text{C}(1')$); 112.42 ($\text{C}(5)$); 123.31, 132.05, 133.89 (6C, Ph); 128.33, 128.47, 128.47, 128.83, 128.86, 129.31, 129.83, 129.83, 129.94, 133.55, 133.62, 133.69 (18C, 3 Ph); 135.87 ($\text{C}(6)$); 150.39 ($\text{C}(2)$); 162.78 ($\text{C}(4)$); 164.64, 165.01, 165.41 (3C, O_2CPh); 168.43 (2C, CO-Ph).

MS (ESI $^+$): 730.2 [$\text{M}+\text{H}$].

Anal.: ber. für $\text{C}_{40}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_{11}$ (729.70): C 65.84, H 4.28, N 5.76;

gef.: C 65.63, H 4.46, N 5.53.

5-(2-Phtalimidoethyl)-1-(β -D-ribofuranosyl)uracil (35)



1. Durchführung

In einem 1-l-Rundkolben wurden 15 g (20 mmol) **34** in 500 ml MeOH gelöst, mit 324 mg (6 mmol) NaOMe versetzt und über Nacht unter Wasserausschluß bei Raum-temp. gerührt (DC-
5 Kontrolle, AcOEt/n-Heptan 1:1). Es wurde solange Amberlite IR-120 zur entstandenen Suspension gegeben bis der pH-Wert <7 war. Es wurde der Feststoff in der Hitze gelöst, heiß vom Ionentauscher abfiltriert und mit MeOH gewaschen. Nach Entfernen der Lösungsmittel wurde der Rückstand zweimal mit je 150 ml Wasser coevaporiert. Dies lieferte 9 g Rohprodukt, das 10 min in 90 ml MeOH unter Rückfluß erhitzt wurde. Nach Abkühlen auf Raumtemp. ver-
10 setzte man mit 60 ml Et₂O und bewahrte über Nacht bei 4°C auf. Filtration, Waschen mit Et₂O und Trocknen im ÖPV lieferte 7.8 g (93%) **35**.

2. Analytische Daten

15 5-(2-Phtalimidoethyl)-1-(β-D-ribosepyranosyl)uracil (**35**):

Schmp.: 137°C (sintern).

DC: CHCl₃/MeOH 5:1, R_f 0.21.

UV (MeOH): λ_{max} 263.0 (8575); λ 299.0 (sh., 1545).

IR (KBr): 3458s, 1772w, 1706s, 1400m, 1364m, 1304m, 1045m.

20 **¹H-NMR** (300 MHz, d₆-DMSO + 2 Tr. D₂O): 2.55 (m_c, 2H, CH₂CH₂N); 3.28-3.61 (m, 4H, H-C(2'), H-C(4'), H_{eq}-C(5'), H_{ax}-C(5')); 3.73 (m_c, 2H, CH₂CH₂N); 3.93 (m, H-C(3')); 5.50 (d, J(H-C(1'), H-C(2')) = 9.3, H-C(1')); 7.41 (s, H-C(6)); 7.84 (s, 4H, NPh).

25 **¹³C-NMR** (75 MHz, d₆-DMSO): 25.63 (CH₂CH₂N); 36.62 (CH₂CH₂N); 64.95 (C(5')); 66.29 (C(4')); 67.37 (C(2')); 71.12 (C(3')); 79.34 (C(1')); 110.39 (C(5)); 122.85, 131.54, 134.08 (6C, Pht); 137.92 (C(6)); 150.84 (C(2)); 163.18 (C(4)); 167.74 (2C, CO-Pht).

MS (ESI⁺): 416.1 [M-H].

30 **1-(2'-O-Benzoyl-β-D-ribosepyranosyl)-5-(2-phtalimidoethyl)-uracil**

In einem ausgeheizten und mit Argon begasten 1-l-Vierhalskolben wurden 10.6 g (0.025 mmol) 5-(2-Phtalimidoethyl)-1-(β-D-ribosepyranosyl)uracil in 20 ml Pyridin gelöst und mit 200

ml Dichlormethan versetzt. Es wurde auf -70°C abgekühlt, unter Kühlung 3.82 ml (0.033 mmol) Benzoylchlorid in 5 ml Pyridin und 20 ml Dichlormethan langsam zugetropft und 35 min bei -70°C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde auf 600 ml gekühlte Ammoniumchlorid-Lösung gegossen und die wäßrige Phase mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen, getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingengt. Chromatographie über Kieselgel (Ethylacetat/Heptan 1:1) lieferte 7.9 g (60%) 1-(2'-O-Benzoyl- β -D-ribofuranosyl)-5-(2-phthalimidoethyl)-uracil.

DC: R_f 0.24 (Ethylacetat/Heptan 4:1).

$^1\text{H-NMR}$ (300 Mhz, d_6 -DMSO): 2.67 (m_e , 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 3.66-3.98 (m , 5H, H-C(4'), H_{eq} -C(5'), H_{ax} -C(5'), $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 4.51 (t , 1H, H-C(3')); 4.98 (dd , 1H, H-C(2')); 6.12 (d , 1H, H-C(1')); 7.19 (s , 1H, H-C(6)); 7.29-7.92 (m , 9H, OBz, NPh).

1-(2-O-Benzoyl-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-ribofuranosyl)-5-(2-phthalimidoethyl)uracil

5.6 g (10.73 mmol) 1-(2-O-Benzoyl- β -D-ribofuranosyl)-5-(2-phthalimidoethyl)uracil wurden in 60 ml Dichlormethan gelöst, mit 4.72 g (13.95 mmol) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid und 2.4 ml (13.95 mmol) N-Ethyl-diisopropylamin versetzt und 20 min bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 100 ml Dichlormethan verdünnt, mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 20% Zitronensäure-Lösung gewaschen, getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingengt. Chromatographie über Kieselgel (Ethylacetat/Heptan 1:1 + 2% Triethylamin) lieferte 7.7 g (87%) 1-(2-O-Benzoyl-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-ribofuranosyl)-5-(2-phthalimidoethyl)uracil.

DC: R_f 0.53 (Ethylacetat/Heptan 1:1 + 2% Triethylamin).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 2.64 (m_e , 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 3.12 (m_e , 1H, H-C(4')); 3.59-3.63 und 3.72-3.92 (m , 5H, H-C(3'), H_{eq} -C(5'), H_{ax} -C(5'), $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 3.81 und 3.82 (s , 6H, CH_3O); 4.70 (dd , 1H, H-C(2')); 6.09 (d , 1H, H-C(1')); 7.05 (s , 1H, H-C(6)); 6.84-7.90 (m , 22H, ODmt, OBz, NPh).

1-(3-O-Benzoyl-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-ribofuranosyl)-5-(2-phthalimidoethyl)uracil

3 g (3.63 mmol) 1-(2-O-Benzoyl-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-ribofuranosyl)-5-(2-phthalimidoethyl)uracil, 1 g (7.26 mmol) 4-Nitrophenol, 0.44 g (3.63 mmol) 4-(Dimethylamino)pyridin und 3.75 ml (21.78 mmol) N-Ethyl-diisopropylamin wurden in 5.6 ml iso-Propanol und 25 ml Pyridin gelöst, auf 65°C erhitzt und 3 Tage bei 65°C gerührt. Die Lösung wurde im
5 Vakuum zur Trockene eingeengt und der Rückstand in 150 ml Dichlormethan gelöst. Nach Waschen mit 20% Zitronensäure-Lösung und Natriumhydrogencarbonat-Lösung wurde über Magnesiumsulfat getrocknet. Chromatographie über Kieselgel (Ethylacetat/Dichlormethan/iso-Hexan 2:1:1) lieferte 2.27 g (76%) 1-(3-O-Benzoyl-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-ribofuranosyl)-5-(2-phthalimidoethyl)uracil.

10 DC: R_f 0.27 (Ethylacetat/iso-Hexan 2:1 + 1% Triethylamin).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 2.39 (m , 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 2.53 (m , 1H, $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(5')$); 3.30 (dd, 1H, $\text{H-C}(2')$); 3.55 (m , 1H, $\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(5')$); 3.69 (m , 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 3.78 und 3.79 (s, 6H, CH_3O); 3.79-3.87 (m, 1H, $\text{H-C}(4')$); 5.74 (d, 1H, $\text{H-C}(1')$); 5.77 (m , 1H, $\text{H-C}(3')$); 6.92 (s, 1H, $\text{H-C}(6)$); 6.74-8.20 (m, 22H, ODmt, OBz, NPht).

15

1-{2'-O-[(Allyloxy)(diisopropylamino)phosphino]-3'-O-benzoyl-4'-O-[(4,4'-dimethoxytriphenyl)-methyl]- β -D-ribo-pyranosyl}-5-(2-phthalimidoethyl)- uracil

88 mg (0.11 mmol) 1-(3-O-Benzoyl-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-ribofuranosyl)-5-(2-phthalimidoethyl)uracil wurden in 5 ml Dichlormethan gelöst, mit 75 μl (0.44 mmol) N-Ethyl-diisopropylamin und 70 μl (0.3 mmol) Allyloxy-chlor-(diisopropylamino)phosphin versetzt und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von weiteren 35 μl (0.15 mmol) Allyloxy-chlor-(diisopropylamino)phosphin zur Vervollständigung der Reaktion wurde noch 1 h bei
20 Raumtemperatur gerührt und das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt. Chromatographie an Kieselgel (Ethylacetat/Heptan: Gradient 1:2 auf 1:1 auf 2:1, jeweils mit 2% Triethylamin) lieferte 85 mg (76%) 1-{2'-O-[(Allyloxy)(diisopropylamino)phosphino]-3'-O-benzoyl-4'-O-[(4,4'-dimethoxytriphenyl)-methyl]- β -D-ribo-pyranosyl}-5-(2-phthalimidoethyl)- uracil.

25

DC: R_f 0.36 (Ethylacetat/Heptan 2:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): Ausgewählte charakteristische Lagen: 2.28, 2.52 (2 dd, $J = 5.0$, 11.0 Hz, 2 H, 2 H-5'), 3.79, 3.78 (app. 2 s, 12 H, OMe), 6.14 (1 bs, 1 H, H-3').

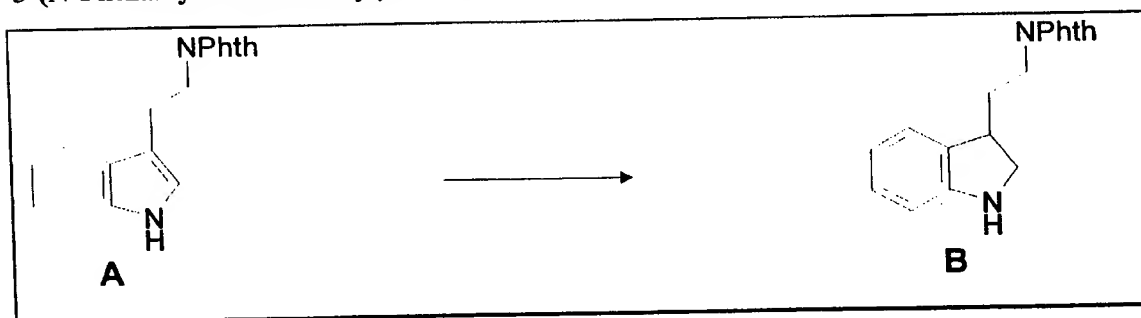
30

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3): 149.8, 150.6

Beispiel 2**Indol-basierender Linker**

N-Phthaloyltryptamin wird wie beschrieben aus Phthalsäureanhydrid und Tryptamin erhalten (Kuehne et al J. Org. Chem. 43, 13, 1978, 2733-2735). Dieses wird mit Boran-THF zum Indolin reduziert (analog A. Giannis, et al., Angew. Chem. 1989, 101, 220).

Das 3-substituierte Indolin wird zuerst mit Ribose zum Nucleosidtriol und dann mit Essigsäureanhydrid zum Triacetat umgesetzt. Man oxidiert mit 2,3-Dichlor-5,6-dicyanoparachinon und spaltet die Acetate mit Natriummethylat, benzyliert selektiv in 2'-Position, DM-trityliert selektiv in 4'-Position, und führt die Wanderungsreaktion zum 3'-Benzoat durch. Die Bildung des Phosphoramidits erfolgt wie üblich. Dieser läßt sich ohne Änderung der Syntheseprotokolle für die automatisierte Oligonucleotidsynthese einsetzen.

Durchführung**3-(N-Phthaloyl-2-aminoethyl)-indolin**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 51.4 g (177 mmol) Phthaloyltryptamin A in 354 ml 1M Boran-THF-Lösung (2 eq.) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Bei 0 °C wurde langsam 354 ml Trifluoressigsäure zugetropft (Vorsicht: Gasentwicklung) und 30 min. nachgerührt (DC-Kontrolle: EtOAc). Dann wurden 17.3 ml Wasser zugegeben, 10 min gerührt und im Vak. eingeeengt. Der Rückstand wurde in 10%iger NaOH-Lösung / Dichlormethan gelöst, die organische Phase wurde abgetrennt, über NaSO₄ getrocknet, filtriert und im Vak. eingeeengt. Der Rückstand (50.9 g) wurde aus heißem Ethanol (3 l) umkristallisiert. Man erhielt 41.4 g B, Smp. 161-162°C. Die Mutterlauge wurde im Vakuum eingeeengt und der Rückstand erneut aus Ethanol umkristallisiert. Man erhielt weitere 3.2 g B, Smp. 158-159 °C. Gesamtausbeute: 44.6 g (153 mmol) B, d. s. 86%.

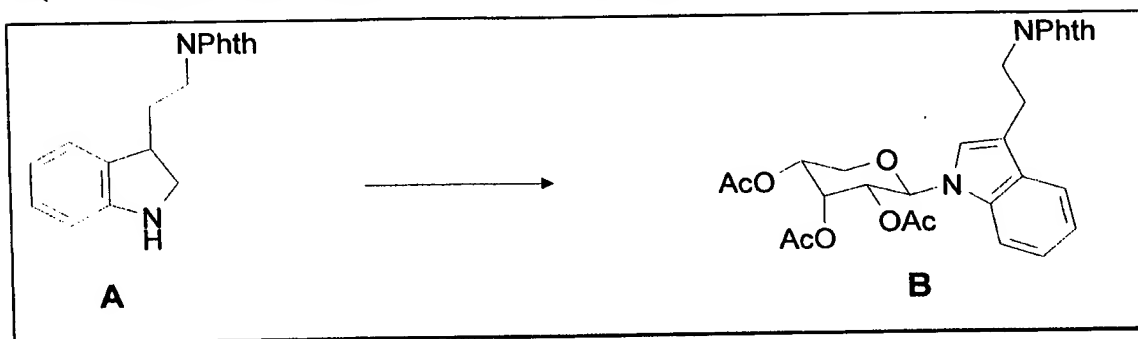
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): 1.85-2.00, 2.14-2.28 (2 m, 2 x 1 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NPhth}$), 2.70 (bs, 1 H, NH), 3.24-3.38, 3.66-3.86 (2 m, 5 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NPhth}$, H-2a, H-2b, H-3), 6.62 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H, H-7), 6.66-6.72 (m, 1 H, H-5), 6.99 (app t, $J = 7.5$ Hz, 1 H, H-6), 7.14 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H, H-4), 7.64-7.74, 7.78-7.86 (2 m, 2 x 2 H, Phth).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): 32.70, 36.10 (2 t, C-2, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NPhth}$), 39.62 (d, C-3), 53.04 (t, CH_2NPhth), 109.65 (d, C-7), 118.74 (d, C-5), 123.25 (d, Phth), 123.92, 127.72 (2 d, C-4, C-6), 131.81 (s, C-3a), 132.14 (s, Phth), 133.99 (d, Phth), 151.26 (s, C-7a), 168.38 (s, C=O).

Ber: C: 73.96, H: 5.52, N: 9.58; gef.: C: 73.89, H: 5.57, N: 9.55.

MS (ES^+): 293 (MH^+ , 100%)

3-(N-Phthaloyl-2-aminoethyl)-1-(2',3',4'-tri-O-acetyl- β -D-ribo-pyranosyl)-indol



Unter Stickstoffatmosphäre wurden 45.2 g (155 mmol) A und 23.2 g (155 mmol; 1.0 eq.) D-Ribose in 750 ml trockenem Ethanol suspendiert und 4 h zum Rückfluß erhitzt (DC-Kontrolle: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10:1). Nach Abkühlen auf RT wurde im Vak. eingeeengt. Der Rückstand wurde in 300 ml Pyridin gelöst und unter Eiskühlung mit 155 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Nach 15 min. wurde das Eisbad entfernt und 18 h bei RT gerührt (DC-Kontrolle: EtOAc/iso-Hexan 1:1). Diese Lösung wurde im Vakuum eingeeengt und 3 mal mit je 300 ml Toluol coevaporiert. Das erhaltene Öl wird in 900 ml Dichlormethan gelöst und unter Eiskühlung mit 38.8 g (171 mmol; 1.1 eq.) 2,3-Dichlor-5,6-dicyanoparachinon versetzt. Nach 15 min. wurde das Eisbad entfernt und 1.5 h bei RT nachgerührt (DC-Kontrolle: EtOAc/iso-Hexan 1:1). Der ausgefallene Niederschlag wurde abgesaugt und mit Dichlormethan gewaschen und verworfen. Das Filtrat wurde mit 600 ml ges. NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Der dabei ausgefallene Niederschlag wurde erneut abgesaugt und mit Dichlormethan gewaschen und verworfen. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über NaSO_4 getrocknet und im

Vak. eingengt. Der Rückstand (90.9 g) wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel 60 gereinigt (10 x 25 cm; EtOAc/iso-Hexan 2:3).

Man erhielt: 21.5 g reines **B** und 46.83 g Mischfraktionen, die nach erneuter Chromatographie weitere 20.4 g reines **B** lieferten.

5 Gesamtausbeute: 41.9 g (76 mmol) **B**, d. s. 49%.

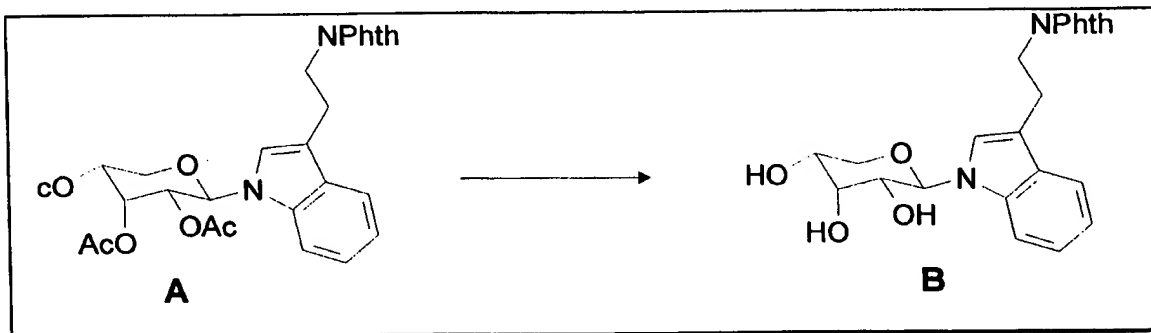
¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): 1.64, 1.98, 2.19 (3 s, 3 x 3 H, Ac), 3.06 (t, J = 8.0 Hz, 2 H, CH₂CH₂NPhth), 3.81-4.00 (m, 4 H, H-5'ax, H-5'eq, CH₂NPhth), 5.13 (ddd, J = 2.5, 6.0, 10.5 Hz, 1 H, H-4'), 5.36 (dd, J = 3.5, 9.5 Hz, 1 H, H-2'), 5.71 (d, J = 9.5 Hz, 1 H, H-1'), 5.74 (app t, J = 3.0 Hz, 1 H, H-3'), 7.02 (s, 1 H, H-2), 7.04-7.10, 7.13-7.19 (2 m, 2 x 1 H, H-5, H-6),
10 7.33 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, H-7), 7.58-7.66, 7.72-7.80 (2 m, 5 H, Phth, H-4).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): 20.23, 20.65, 20.87 (3 q, Ac), 24.41, 38.28 (2 t, CH₂CH₂), 63.53 (t, C-5'), 66.24, 68.00, 68.64 (3 d, C-2', C-3', C-4'), 80.33 (d, C-1'), 109.79 (d, C-7), 113.95 (s, C-3), 119.33, 120.39, 122.04, 122.47 (4 d, C-4, C-5, C-6, C-7), 123.18 (d, Phth), 128.70, 132.17 (2 s, C-3a, Phth), 133.87 (d, Phth), 136.78 (s, C-7a), 168.24, 168.77, 169.44, 169.87 (4
15 s, C=O).

Ber: C: 63.50, H: 5.15, N: 5.11; gef.: C: 63.48, H: 5.16, N: 5.05.

MS (ES⁺): 566 (M+NH₄⁺, 82%), 549 (MH⁺, 74%), 114 (100%).

3-(N-Phthaloyl-2-aminoethyl)-1-β-D-ribo-pyranosyl-indol



25 Unter Stickstoffatmosphäre wurden 44.1 g (80 mmol) **A** in 400 ml wasserfreiem Methanol gelöst. Unter Eiskühlung versetzte man mit 4.0 ml 30%iger Natriummethylatlösung und rührte dann 18 h bei RT. Der ausgefallene Niederschlag wurde abgesaugt und mit kaltem Ethanol gewaschen. Das Filtrat wurde im Vak. eingengt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen. Diese Lösung wurde mit ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen, über NaSO₄ getrocknet und im Vak. eingengt. Der erhaltene Rückstand wurde zusammen mit dem

aus der Reaktionslösung ausgefallenen Niederschlag aus heißem Ethanol umkristallisiert. Man erhielt 22.6 g **B**, Smp. 196-198 °C. Die Mutterlauge wurde im Vakuum eingengt und der Rückstand erneut aus Ethanol umkristallisiert. Man erhielt weitere 9.2 g **B**, Smp. 188-194 °C. Gesamtausbeute: 25.8 g **B**, d. s. 76%.

5

¹H-NMR (MeOD, 300 MHz): 3.09 (app. t, J = 7.0 Hz, 2 H, CH₂CH₂NPhth), 3.64-3.98 (m, 5 H, H-4', H-5'ax, H-5'eq, CH₂NPhth), 4.05 (dd, J = 3.5, 9.5 Hz, 1 H, H-2'), 4.22 (app t, J = 3.0 Hz, 1 H, H-3'), 5.65 (d, J = 9.5 Hz, 1 H, H-1'), 6.95-7.05, 7.09-7.16 (2 m, 2 x 1 H, H-5, H-6), 7.25 (s, 1 H, H-2), 7.44 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, H-7), 7.60 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, H-4), 7.74-7.84 (m, 4 H, Phth).

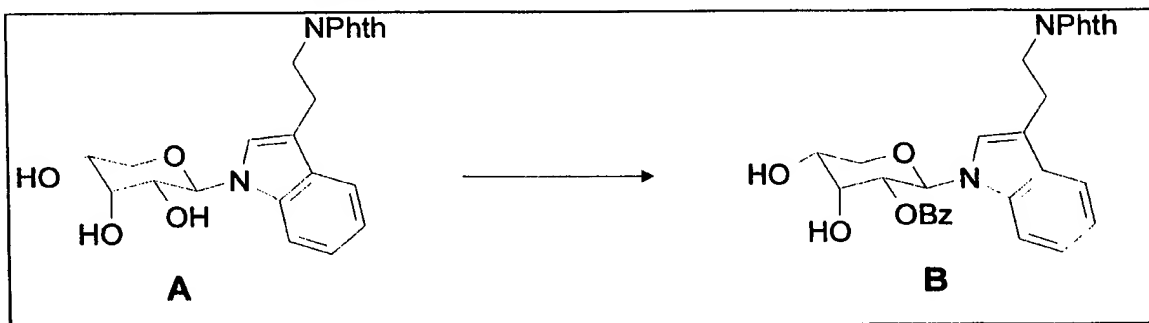
10

¹³C-NMR (d₆-DMSO, 75 MHz): 23.87, 37.79 (2 t, CH₂CH₂NPhth), 64.82 (t, C-5'), 66.74 (d, C-4'), 68.41 (d, C-2'), 71.42 (d, C-3'), 81.37 (d, C-1'), 110.42 (d, C-7), 111.05 (s, C-3), 118.17, 119.21, 121.36, 122.92, 123.80 (5 d, C-2, C-4, C-5, C-6, NPhth), 127.86, 131.59 (2 s, C-3a, Phth), 134.27 (d, Phth), 136.62 (s, C-7a), 167.72 (s, C=O).

15

MS (ES⁻): 457 (M+OH⁻+H₂O, 49%), 439 (M+OH⁻, 100%), 421 (M-H⁺, 28%)

1-(2'-O-Benzoyl-β-D-ribo-pyranosyl)-3-(N-phthaloyl-2-aminoethyl)-indol



20

Unter Stickstoffatmosphäre wurde 10.6 g (25 mmol) **A** in 250 ml trockenem Dichlormethan aufgenommen. Man versetzt mit 305 mg DMAP (2.5 mmol) und 20 ml Pyridin. Es wurde erwärmt bis alles in Lösung war und anschließend auf -78 °C abgekühlt. Jetzt wurde 3.35 ml Benzoylchlorid (28.8 mmol) gelöst in 8 ml Dichlormethan innerhalb von 15 min zugetropft. DC-Kontrolle (EtOAc/Hexan 3:1) nach weiteren 30 min zeigte vollständige Reaktion an.

25

Nach 45 min wurde die kalte Lösung über einen Faltenfilter direkt auf 200 ml ges. NH₄Cl-Lösung gegeben und der Filtrerrückstand wurde mit Dichlormethan gewaschen. Die organische Phase wurde einmal mit Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und eingengt. Der

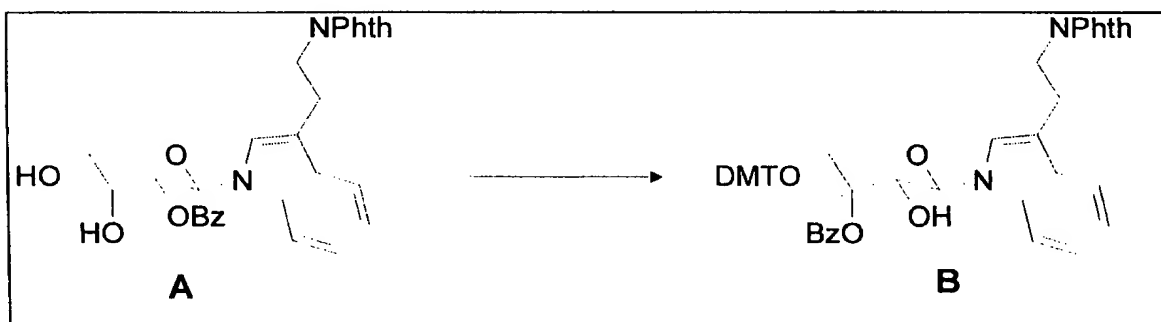
Rückstand wurde 2 mal mit Toluol coevaporiert und durch Flashchromatographie an 10 x 20 cm Kieselgel mit EtOAc/Hexan 3:1 gereinigt. Man erhielt 8.1 g **B** (64%).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): 2.45, 2.70 (2 bs, 2 x 1 H, OH), 3.04 (t, J = 8.0 Hz, 2 H, CH₂CH₂NPhth), 3.80-4.20 (m, 5 H, H-4', H-5'ax, H-5'eq, CH₂NPhth), 4.63 (bs, 1 H, H-3'),
 5.46 (dd, J = 3.5, 9.5 Hz, 1 H, H-2'), 6.03 (d, J = 9.5 Hz, 1 H, H-1'), 7.08-7.31 (m, 5 H, H-2, H-5, H-6, Bz-m-H), 7.41-7.48 (m, 1 H, H-Bz-p-H), 7.50 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, H-7), 7.64-7.79 (m, 7 H, Phth, H-4, Bz-o-H).

¹³C-NMR (d₆-DMSO, 75 MHz): 24.40, 38.22 (2 t, CH₂CH₂NPhth), 65.95 (t, C-5'), 66.65 (d, C-4'), 69.55 (d, C-3'), 71.87 (d, C-2'), 79.57 (d, C-1'), 109.96 (d, C-7), 113.70 (s, C-3), 119.21, 120.21, 122.11, 122.41, 123.14 (5 d, C-2, C-4, C-5, C-6, NPhth), 128.28 (d, Bz), 128.58, 128.59 (2 s, C-3a, Bz), 129.62 (d, Phth), 132.05 (s, Phth), 133.81 (Bz), 136.97 (s, C-7a), 165.12, 168.29 (2 s, C=O).

MS (ES⁻): 525 (M-H⁺, 12%), 421 (M-PhCO⁺, 23%), 107 (100%).

1-{3'-O-Benzoyl-4'O-[(4,4'-dimethoxytriphenyl)-methyl]-β-D-ribo-pyranosyl}-3-(N-phthaloyl-2-aminoethyl)-indol



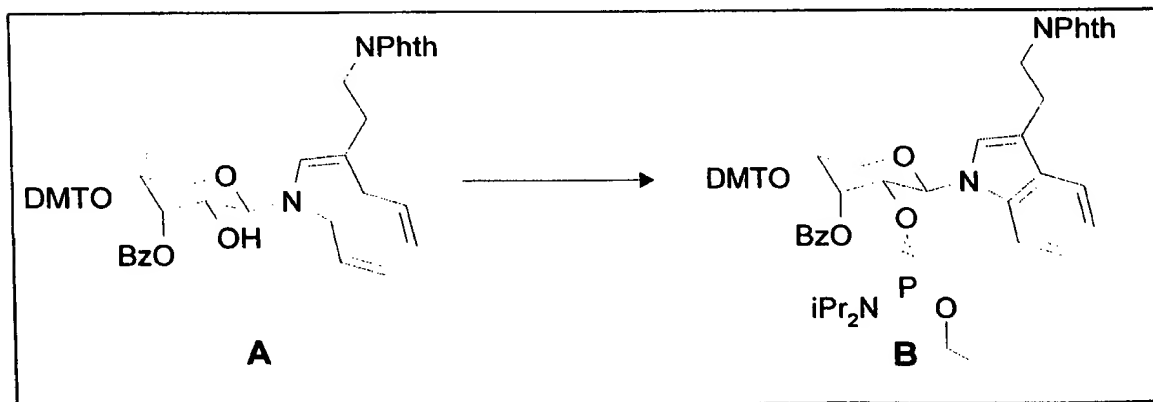
Unter Stickstoffatmosphäre wurde 8.9 g (16.9 mmol) **A** in 135 ml trockenem Dichlormethan suspendiert. Man versetzte mit 206 mg DMAP (1.68 mmol), 5.8 ml N-Ethyl-diisopropylamin (33.7 mmol) und ca. 12 ml Pyridin (bis zur vollständigen Lösung). Jetzt wurde mit 34 g Mol-sieb 4* versetzt und 30 min gerührt. Nach Abkühlen auf 0 °C wurde mit 11.4 g DMTCl (33.7 mmol) versetzt und nach Entfernen des Kühlbads 75 min gerührt. Dann wurden nochmals 1.94 g (0.34 eq) und nach weiteren 40 min 1.14 g (0.2 eq) und nach weiteren 65 min 1.14 g DMTCl (0.2 eq) zugegeben. Nach 4.25 h war die Reaktion beendet. Man versetzte dann mit 25.3 ml n-Propanol (20 eq), rührte noch 30 min nach und engte dann vorsichtig ein (Schaumbildung). Der Rückstand wurde in 100 ml Pyridin gelöst. Man versetzte mit 1.85 g DMAP

(15.1 mmol; 0.9 eq), 13.05 ml N-Ethyldiisopropylamin (101 mmol; 6.0 eq), 71 ml n-Propanol (940 mmol; 56 eq) und 3.74 g p-Nitrophenol (26.9 mmol; 1.6 eq). Diese Mischung wurde unter Stickstoff 96 h bei 75-80 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Mischung über Celite filtriert und eingeeengt. Der Rückstand wurde durch Flashchromatographie an 9 x 17 cm Kieselgel mit Toluol/Diethylether/Triethylamin 90:10:1 gereinigt. Die produktthaltigen Fraktionen (9.25 g) wurden zunächst aus EtOAc umkristallisiert und anschließend aus Toluol/Methanol umgefällt. Man erhielt 5.86 g **B** (42%).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): 2.64 (bs, 1 H, OH), 2.68 (dd, J = 5.0, 11.5 Hz, 1 H, H-5'eq), 2.94 (dd, J = 7.5, 16.0 Hz, 1 H, CH₂CH₂NPhth), 3.03 (dd, J = 8.0, 16.0 Hz, 1 H, CH₂CH₂NPhth), 3.67-3.74 (m, 1 H, H-5'ax), 3.69, 3.70 (2 s, 2 x 3 H, OMe), 3.85 (t, J = 7.5 Hz, 2 H, CH₂CH₂NPhth), 3.94 (ddd, J = 3.0, 5.0, 10.5 Hz, 1 H, H-4'), 4.03 (dd, J = 3.5, 9.0 Hz, 1 H, H-2'), 5.51 (d, J = 9.0 Hz, 1 H, H-1'), 5.86 (bs, 1 H, H-3'), 6.68-7.66 (m, 25 H), 8.19-8.30 (m, 2 H).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): 24.16, 38.80 (2 t, CH₂CH₂NPhth), 55.25, 55.26 (2 q, Ome), 65.58 (t, C-5'), 68.29, 69.19, 73.83 (3 d, C-2', C-3', C-4'), 83.03 (d, C-1'), 87.31 (C_{Ar3}), 110.03 (d, C-7), 113.37, 113.47 (2 d), 113.53 (s, C-3), 118.95, 120.20, 122.28, 122.31, 123.10, 127.07, 128.02, 128.08, 128.68 (9 d), 128.74 (s), 130.02, 130.19, 130.22 (3 d), 130.37, 131.95 (2 s), 133.40, 133.83 (2 d), 135.98, 136.14, 136.56, 145.12, 158.82, 166.76, 168.52 (7 s, C-7a, 2 COMe, 2 C=O).

1-{2'O-(Allyloxy)(diisopropylamino)phosphino}-3'-O-Benzoyl-4'O-[(4,4'-dimethoxytriphenyl)-methyl]-β-D-ribo-pyranosyl}-3-(N-phthaloyl-2-aminoethyl)-indol
(2 Diastereomere)



Unter Argonatmosphäre wurde 1658 mg Alkohol A (2.0 mmol) in 10 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Man versetzte mit 1.03 ml N-Ethyl-diisopropylamin (6.0 mmol) und 0.63 ml Phosphorigsäuremonoallylesterdiisopropylamidchlorid (2.8 mmol) und rührte 1 h bei Raumtemperatur. Dann wurde das überschüssige Phosphorylierungsreagenz durch Zugabe von 61 µl (0.8 mmol) Isopropanol zerstört. Nach 10 min wurde im Vakuum eingeeengt und der Rückstand durch Flashchromatographie an 3.3 x 21 cm Kieselgel mit Hexan/EtOAc/NEt₃ (75:25:1) gereinigt. Die produkthaltigen Fraktionen wurden eingeeengt, in CCl₄ aufgenommen und wieder eingeeengt. Man erhielt 2.04 g eines fast farblosen Schaums (quant.), der so direkt zur Oligomerisierung verwendet werden kann und bei -20 °C mehrere Wochen haltbar ist.

DC auf Kieselgel (EtOAc/Hexan/ NEt₃ 33:66:1): 0.41

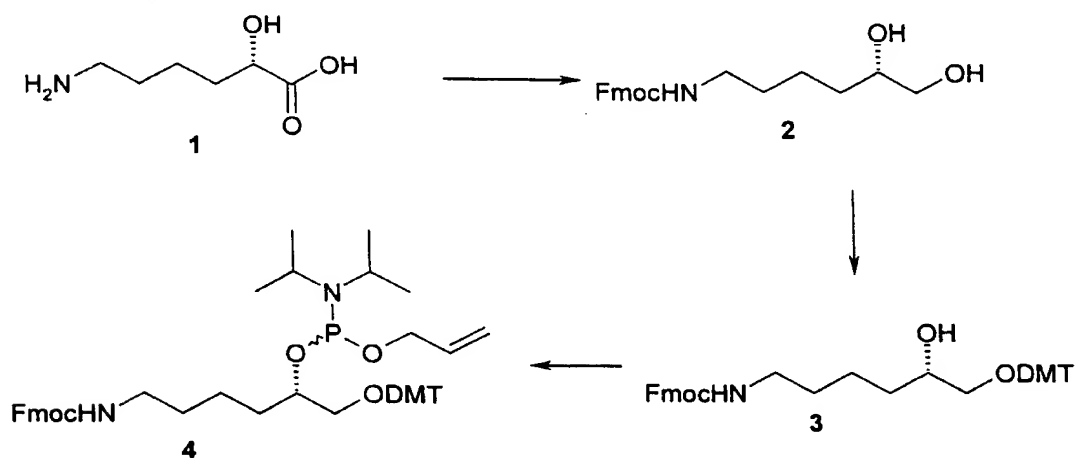
¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): Ausgewählte charakteristische Lagen: 2.42, 2.53 (2 dd, J = 5.0, 11.0 Hz, 2 H, 2 H-5'eq), 3.76, 3.77, 3.78, 3.79 (4 s, 4 x 3 H, OMe), 5.70, 5.73 (2 d, J = 9.0 Hz, 2 H, 2 H-1'), 6.16, 6.29 (2 bs, 2 H, 2 H-3').

³¹P-NMR (CDCl₃): 150.6, 151.0

Beispiel 3

Lysin-basierender Linker

Die Synthese ist im Schema 4 abgebildet und wird im folgenden im Detail beschrieben.



Schema 4: Synthese des Lysinlinkers

6-Amino-2(S)-hydroxyhexansäure (1) wurde nach literaturbekannter Weise durch Diazotierung und anschließende Hydrolyse aus L-Lysin hergestellt (K.-I. Aketa, Chem. Pharm Bull. 1976, 24, 621).

5

2-(S)-N-Fmoc-6-amino-1,2-hexandiol (2)

3.4 g LiBH_4 (156 mmol, 4 eq) werden unter Argon in 100 ml abs. THF gelöst (exotherm!). Nach Abkühlen auf ca. 30 °C werden 39.6 ml TMSCl (312 mmol, 8 eq) langsam zugetropft (Gasentwicklung!), wobei sich ein Niederschlag bildet. Anschließend werden im Argon-
10 Gegenstrom 5.74 g 6-Amino-2(S)-hydroxyhexansäure (1) (39 mmol) portionsweise zugegeben und es wird auf 65 °C erwärmt, bis das DC (Kieselgel; i-PrOH/konz. NH_4OH /Wasser 7:2:1; Anfärben mit Ninhydrin) kein Edukt mehr zeigt (ca. 3 h). Unter Eiskühlung wird vorsichtig mit 120 ml Methanol versetzt (starke Gasentwicklung!). Das Lösungsmittel wird im Vakuum eingeeengt, der Rückstand wird 3 mal mit je 200 ml Methanol coevaporiert und anschließend in 100 ml abs. DMF gelöst. Nach Zugabe von 16 ml Ethyldiisopropylamin (93.6
15 mmol, 2.4 eq) wird die Mischung auf 0°C gekühlt und portionsweise mit 12.1 g FmocCl (46.8 mmol, 1.2 eq) versetzt. Nach 15 Minuten wird das Kühlbad entfernt und bei Raumtemperatur gerührt bis das Edukt verbraucht ist (ca. 3 h; DC-Kontrolle: Kieselgel; $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{HOAc}/\text{Wasser}$ 60:30:3:5). Die Reaktionslösung wird auf 600 ml ges. NaHCO_3 -
20 Lösung gegeben. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit 200 ml Wasser gewaschen und bei 50 °C am HV getrocknet bis zur Gewichtskonstanz (ca. 6 h). Man erhält 13.9 g eines farblosen Feststoffs, der aus Ethylacetat (40 ml)/n-Hexan (35 ml) umkristallisiert wird. Ausbeute: 9.05 g (65%).

25 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 7.68, 7.51 (2 d, $J = 8.0$ Hz, je 2 H, Ar-H), 7.32 (t, $J = 8.0$ Hz, 2 H, Ar-H), 7.23 (dt, $J = 1.6, 8.0$ Hz, 2 H, Ar-H), 4.92 (bs, 1 H, NH), 4.32 (d, $J = 7.0$ Hz, 2 H, OCOCH_2), 4.13 (bt, $J = 7.0$ Hz, 1 H, OCOCH_2CH), 3.64-3.58 (m, 1 H, H-1, H-1', H-2, H-6, H-6'), 3.54 (dd, $J = 3.2, 11.0$ Hz, 1 H, H-1, H-1', H-2, H-6, H-6'), 3.35 (dd, $J = 7.4, 11.0$ Hz, 1 H, H-1, H-1', H-2, H-6, H-6'), 3.16-3.06 (m, 2 H, H-1, H-1', H-2, H-6, H-6'), 3.0-2.0 (bs, 2
30 H, OH), 1.52-1.18 (m, 6 H, H-3, H-3', H-4, H-4', H-5, H-5').

2-(S)-N-Fmoc-O¹-DMT-6-amino-1,2-hexandiol (3) wurde nach WO 89/02439 DM-trityliert.

2-(S)-N-Fmoc-O¹-DMT-O²-allyloxydiisopropylaminophosphinyl-6-amino-1,2-hexandiol (4)

Zu einer Lösung von 670 mg des Alkohols (3) (1.02 mmol) in 10 ml abs. Dichlormethan werden unter Argon 0.51 ml Ethyldiisopropylamin (3.0 mmol, 3 eq) und 0.33 ml Chlor-N,N-diisopropylaminoallyloxyposphin (1.5 mmol, 1.5 eq) gegeben. Man rührt 2 h bei Raumtemperatur, zieht das Lösungsmittel im Vakuum ab und reinigt den erhaltenen Rückstand durch Flashchromatographie an 3.2 x 16 cm Kieselgel (EtOAc/iso-Hexan/NEt₃ 20:80:1). Man erhält 839 mg (97%) eines leicht gelblichen Öls.

10 DC: Kieselgel; EtOAc/iso-Hexan/NEt₃ 50:50:1; UV; R_f = 0.77.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 7.70-6.68 (m, 21 H, Ar-H), 4.92-4.62 (m, 1 H, NH), 4.31 (d, J = 7.0 Hz, 2 H, OCOCH₂), 4.13 (t, J = 7.0 Hz, 1 H, OCOCH₂CH), 3.98-3.40 (m, 5 H), 3.77 (2 s, je 3 H, OMe), 3.16-2.86 (m, 4 H), 2.58 (t, J = 7.0 Hz, 1 H, CHCN), 2.38 (t, 1 H, CHCN),
15 1.80-1.20 (m, 6 H), 1.20, 1.18, 1.17, 1.16, 1.15, 1.13, 1.08, 1.06 (8 s, 12 H, NMe).

³¹P-NMR (300 MHz, CDCl₃): 149.5, 149.0 (2 s)

Beispiel 4

20

Synthese eines p-RNA-Oligos der Sequenz 4'-Indollinker-A8-2' unter Verwendung von Benzimidazoliumtriflat als Kupplungsreagenz

108 mg Indollinker-Phosphoramidit und 244 mg A-Phosphoramidit werden in Synthesizergläschen eingewogen und für 3 h im Exsikkator über KOH zusammen mit dem mit 28,1 mg CPG-Träger, beladen mit A-Baustein, gefüllten Säulchen am HV belassen. Die Phosphoramidite werden in 1 ml (Indollinker) bzw. 2,5 ml (A-Phosphoramidit) Acetonitril gelöst und einige Kügelchen von dem Molsieb zugesetzt und über KOH geschlossen im Exsikkator belassen. 200 mg Jod werden unter starkem Rühren in 50 ml Acetonitril gelöst. Nachdem alles gelöst ist
30 (Sichtkontrolle) werden 23 ml Wasser und 4,6 ml sym-Collidin zugegeben und die Lösung einmal gut durchmischt. Zum Detritylieren wird eine 6 %ige Lösung von Dichloressigsäure in Dichlormethan eingesetzt. Das Cappingreagenz (Acetanhydrid + Base) wird wie für Oligonucleotidsynthese üblich gekauft und verwendet.

Benzimidazoliumtriflat wird aus heißem Acetonitril umkristallisiert und getrocknet. Mit den fast farblosen Kristallen wird eine 0,1 M Lösung in wasserfreiem Acetonitril als Kupplungsreagenz hergestellt. Während der Synthese bleibt diese Lösung immer klar und es kommt zu
 5 keinen Verstopfungen der Synthesizerschläuche.

Abgeänderter DNA-Kupplungszyklus am Eppendorf Ecosyn 300+ (DMT-on):

	Detritylierung	7 Minuten
	Kupplung	1 Stunde
10	Capping	1,5 Minuten
	Oxidation	1 Minute

20 mg Tetrakis(triphenylphosphin)palladium wird in 1,5 ml Dichlormethan gelöst, 20 mg Diethylammoniumhydrogencarbonat, 20 mg Triphenylphosphin und der das Oligonucleotid tragende Glaträger zugesetzt, dicht verschlossen (Parafilm) und das Gläschen 5 h bei RT.
 15 bewegt. Dann wird der Glaträger über eine Analysennutsche abgesaugt, und mit Dichlormethan, mit Aceton und mit Wasser gewaschen.

Der Träger wird mit wäßriger 0,1molarer Natriumdiethyldithiocarbamatlösung aufgeschlämmt und 45 min bei RT. belassen. Man saugt ab, wäscht mit Wasser, Aceton, Ethanol und Dichlormethan. Der Träger wird in 1,5 ml 24 %iger Hydrazinhydratlösung suspendiert, 24-36 h lang bei 4 °C gerüttelt und mit 0,1molarem Triethylammoniumhydrogencarbonatpuffer (TEAB-Puffer) auf 7 ml verdünnt. Über eine Waters Sep-Pak Cartridge wurde hydrazinfrei
 25 gewaschen. Es wird mit 5 ml einer 80%igen Ameisensäurelösung versetzt, und nach 30 min zur Trockene einrotiert. Der Rückstand wird in 10 ml Wasser aufgenommen, mit Dichlormethan extrahiert, die wäßrige Phase eingeengt und nun HPL-chromatographiert (tR = 33 min, Gradient von Acetonitril in 0,1M Triethylammoniumacetat-Puffer). Übliche Entsalzung (Waters Sep-Pak Cartridge) liefert das Oligonucleotid.

Ausbeute: 17, 6 OD.

30 Substanzidentität nachgewiesen durch ESI-Massenspektroskopie:

$M(\text{ber}) = 3082 \text{ D}$, $(M+2H)^{2+}(\text{gef}) = 1541,9 \text{ D}$.

Beispiel 5

Herstellung von Konjugaten

1. Sequentielles Verfahren

5

Zuerst wird, wie in Beispiel 2 beschrieben, ein p-RNA-Oligomeres der Sequenz A₈, d. h. ein Octamer, auf dem Eppendorf Ecosyn D 300+ hergestellt und dann die folgenden Reagenzien ausgetauscht: 6%ige Dichloressigsäure gegen 2%ige Trichloressigsäure, Jod in Collidin gegen Jod in Pyridin, Benzimidazoltriflatlösung gegen Tetrazollösung. Nach Änderung des Syntheseprogramms wird ein DNA-Oligomeres der Sequenz GATTC nach bekannten Methoden (M. J. Gait, Oligonucleotide Synthesis, IRL Press, Oxford, UK 1984) weiter synthetisiert. Die Deallylierung, Hydrazinolyse, HPL-Chromatographie und/oder Gelelektrophorese und Entsalzung erfolgt wie für das p-RNA-Oligomere beschrieben (siehe oben) und liefert das gewünschte Konjugat.

15

2. Konvergentes Verfahren

Wie in Beispiel 2 beschrieben, wird ein p-RNA-Oligomeres mit der Sequenz 4'-Indollinker-A₈-2' hergestellt, aufgereinigt, und jodacetyliert. Ein DNA-Oligomeres der Sequenz GATTC-Thiol-Linker wird nach bekannten Methoden (M. J. Gait, Oligonucleotide Synthesis, IRL Press, Oxford, UK 1984) synthetisiert und aufgereinigt (3'-Thiol-Linker von Glen Research: Nr. 20-2933). Beim Stehenlassen der beiden Fragmente (T. Zhu et al., Bioconjug. Chem. 1994, 5, 312) in gepufferter Lösung entsteht das Konjugat, das abschließend über HPLC aufgereinigt wird.

25

Beispiel 6

Synthese eines einen Linker enthaltenden p-RNA-Oligonucleotids mit Linker der Formel 4' AGGCAIndT 2':

30

1.1 Festphasensynthese des Oligonucleotids

A, G, C, T steht für die Nucleobasen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin und Ind bedeutet Aminoethylindol (Indol $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$) als Linker in Form einer Nucleobase.

Die vollautomatische Festphasensynthese wurde mit jeweils 15 μmol durchgeführt. Ein
5 Syntheszyklus besteht aus den folgenden Schritten:

- (a) Detritylierung: 5 Minuten mit 6% DCA (Dichloressigsäure) in CH_2Cl_2 (79 ml).
- (b) Waschen mit CH_2Cl_2 (20 ml), Acetonitril (20 ml) und danach Spülen mit Argon;
- (c) Kupplung: Waschen des Harzes mit dem Aktivator (0,5 M • Pyridin.HCl in CH_2Cl_2 (0,2
ml) und anschließend 30minütiges Behandeln mit Aktivator (0,76 ml) und Phosphorami-
10 dit der entsprechenden Nucleobase (0,76 ml : 8 eq; 0,1 M in Acetonitril) im Verhältnis
1/1;
- (d) Capping: 2-minütiges Behandeln mit 50% Cap A (10,5 ml) und 50% Cap B (10,5 ml) von
PerSeptive Biosystems, Inc., Texas, USA (Cap A: THF, Lutidine, Acetanhydrid; Cap B:
1-Methylimidazol, THF, Pyridin);
- 15 (e) Oxidation: 1-minütiges Behandeln mit 120 ml Iodlösung (400 mg Jod in 100 ml Acetoni-
tril, 46 ml H_2O und 9,2 ml sym-Collidine); und
- (f) Waschen mit Acetonitril (22 ml).

Zur Erleichterung der nachfolgenden HPLC Reinigung der Oligonucleotide wurde die letzte
20 DMT(Dimethoxytrityl)-Gruppe nicht abgespalten. Zum Nachweis der letzten Kupplung mit
den modifizierten Phosphoramiditen wurde nach der Synthese mit 1% des Harzes eine Trityl-
kationabsorption in UV (503 nm) durchgeführt.

1.2 Aufarbeitung des Oligonucleotids:

25

Die Abspaltung der Allyletherschutzgruppen erfolgte mit einer Lösung von Tetra-
kis(triphenylphosphin)palladium (272mg), Triphenylphosphin (272 mg) und Diethylammoni-
umhydrogencarbonat in CH_2Cl_2 (15ml) nach 5 Stunden bei RT. Die Glaträger wurden danach
mit CH_2Cl_2 (30ml), Aceton (30ml) und Wasser (30ml) gewaschen. Um Palladiumkomplexre-
30 ste zu entfernen, wurde das Harz mit einer wäßrigen 0,1 M Natriumdiethyldithiocarbamat-
lösung gespült. Die obenerwähnte Waschoperation wurde in einer umgekehrten Reihe
noch einmal durchgeführt. Anschließend wurde das Harz am Hochvakuum 10 Minuten ge-
trocknet. Der Abspaltungsschritt vom Glaträger bei gleichzeitiger Debenzoylierung wurde in

24% Hydrazinhydratlösung (6ml) bei 4°C durchgeführt. Nach HPLC-Kontrolle an RP 18 (18-25 Stunden) wurde das Oligonucleotid „Trityl ON“ mittels einer aktivierten (Acetonitril, 20 ml) Waters Sep-Pak Cartridge vom Hydrazin befreit. Das Hydrazin wurde mit TEAB, 0,1M (30ml) gewaschen. Das Oligonucleotid wurde dann mit Acetonitril/TEAB, 0,1M (10ml) eluiert. Anschließend wurde mittels HPLC zur Abtrennung von Abbruchsequenzen gereinigt und die DMT-Entschützung (30 ml 80%ig wäßrige Ameisensäure) durchgeführt. Abschließende Entsalzung (über Sep-Pak Kartusche, mit TEAB Puffer 0,1M/Acetonitril: 1/1) lieferte das reine Oligonucleotid.

10 Beispiel 7

Jodacetylierung von *p*-RNA mit N-(Jodacetyloxy)-succinimid

15 *p*-RNA-Sequenz : 4' AGGCAIndT 2' $M_w = 2266,56$ g/mol, hergestellt gemäß Beispiel 1.

1 eq. der *p*-RNA wurde in einer 0,1 molaren Natriumhydrogencarbonatlösung (pH 8,4) gelöst (1 ml pro 350 nmol) und mit einer Lösung von N-(Jodacetyloxy)-succinimid in DMSO versetzt (40 µl pro mg). Man dunkelt den Ansatz mit Aluminiumfolie ab und ließ ihn bei Raumtemperatur für 30-90 Minuten stehen.

Der Fortgang der Reaktion wurde mittels analytischer HPLC verfolgt. Die Standardbedingungen waren:

Puffer A : 0,1 molarer Triethylammoniumacetat-Puffer in Wasser

25 Puffer B : 0,1 molarer Triethylammoniumacetat-Puffer in Wasser:Acetonitril 1:4

Gradient : von 10% B startend auf 50% B in 40 Minuten

Säulenmaterial : 10 µM LiChrosphere® 100 RP-18 von Merck Darmstadt GmbH; 250 x 4 mm

Retentionszeit der Edukte: 18,4 Minuten

Retentionszeit der Produkte in diesem Falle : 23,1 Minuten

30

Nach beendeter Reaktion wurde der Ansatz mit Wasser auf das vierfache Volumen verdünnt. Man aktivierte eine Waters Sep-Pak-Kartusche RP-18 (ab 15 OD 2 g Füllung) mit 2 x 10 ml Acetonitril und 2 x 10 ml Wasser, trug das Oligonucleotid auf, ließ einsinken, wusch das Re-

aktionsgefäß mit 2 x 10 ml Wasser, wusch mit 3 x 10 ml Wasser nach, um Salz und Reagenz zu entfernen, und eluierte zuerst mit 5 x 1 ml 50:1 Wasser : Acetonitril und anschließend mit 1:1. Das Produkt eluierte in den 1:1-Fractionen in sehr guter Reinheit. Die Fractionen wurden in der Kälte und im Dunkeln eingeeengt, vereinigt, und wieder eingeeengt.

5

Die Ausbeuten wurden mittels UV-Absorptionspektrometrie bei 260 nm bestimmt.

Massenspektrometrie :

Sequenz : 4' AGGCAInd(CH₂CH₂NHCOCH₂-I)T 2'

berechnete Masse : 2434.50 g/mol

10 gefundene Masse MH₂²⁺: 1217.9 g/mol = 2433

Beispiel 8

Konjugation von *p*-RNA an ein definiertes Peptid (CYSKVG)

15

Die jodacetylierte *p*-RNA (M_w = 2434.50 g/mol) wurde in einem Puffersystem gelöst (1000µl pro 114 nmol) und dann mit einer Lösung des Peptides in Puffer versetzt (2 moleq. CYSKVG-Peptid; M_w = 655,773 g/mol; 228 nmol in 20 µl Puffer).

15 Puffersystem : Borax/HCl-Puffer der Firma Riedel-de Haën, pH 8,0, wurde im Verhältnis 1:1 mit einer 10 millimolaren Lösung von EDTA-Dinatriumsalz in Wasser gemischt und auf pH 6.3 mit HCl eingestellt. Man erhielt dadurch eine Lösung, die 5 mM Na₂EDTA enthält.

Man beließ den Ansatz bis zum vollständigen Umsatz bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Reaktion wurde mittels HPLC-Analytik verfolgt.

25 Die Standardbedingungen waren :

Puffer A : 0,1 molarer Triethylammoniumacetat-Puffer in Wasser

Puffer B : 0,1 molarer Triethylammoniumacetat-Puffer in Wasser:Acetonitril 1:4

Gradient : von 10% B startend auf 50% B in 40 Minuten

Säulenmaterial : 10 µM LiChrosphere® 100 RP-18 von Merck Darmstadt GmbH; 250 x 4

30 Retentionszeit des Eduktes : 17,6 Minuten

Retentionszeit des Produktes : 15,5 Minuten

Nach beendeter Reaktion wurde der Ansatz direkt mittels RP-HPLC gereinigt.

(Standardbedingungen siehe oben).

Die Fraktionen wurden in der Kälte und im Dunkeln eingeengt, vereinigt, und wieder eingeengt. Man nahm in Wasser auf und entsalzte. Man aktivierte eine Waters Sep-Pak-Kartusche RP-18 (ab 15 OD 2 g Füllung) mit 2 x 10 ml Acetonitril und 2 x 10 ml Wasser, trug das Oligo
5 auf, ließ einsinken, wusch das Reaktionsgefäß mit 2 x 10 ml Wasser, wusch mit 3 x 10 ml Wasser nach, um das Salz zu entfernen, und eluierte mit Wasser : Acetonitril 1:1. Die Produkt-Fractionen wurden eingeengt, vereinigt, und wieder eingeengt.

Die Ausbeuten wurden mittels UV-Absorptionspektrometrie bei 260 nm bestimmt. Sie erreichten 70-95% der Theorie.

10

Massenspektrometrie :

Sequenz : 4' AGGCAInd(CH₂CH₂NHCOCH₂-CYSKVG)T 2'

berechnete Masse MH₂²⁺: 2962,36 g/mol

gefundene Masse MH₂²⁺: 1482,0 g/mol

15

Beispiel 9

Konjugation von *p*-RNA an eine Peptidbibliothek

20 Die jodacetylierte *p*-RNA ($M_w = 2434,50$ g/mol) wurde in einem Puffersystem gelöst (1300 µl pro 832 nmol) und dann mit einer Lösung der Peptidbibliothek (CKR-XX-OH; X = Arg, Asn, Glu, His, Leu, Lys, Phe, Ser, Trp, Tyr) in Puffer versetzt (8 moleq.; mittlere Molekülmasse $M_m = 677,82$ g/mol; 4,5 mg = 6,66 µmol in 200 µl Puffer).

Puffersystem : Borax/HCl-Puffer der Firma Riedel-de Haën, pH 8,0, wurde im Verhältnis 1:1
25 mit einer 10 millimolaren Lösung von EDTA-Dinatriumsalz in Wasser gemischt und auf pH 6,6 mit HCl eingestellt. Man erhielt dadurch eine Lösung, die 5 mM Na₂EDTA enthielt.

Man beließ den Ansatz bis zum vollständigen Umsatz bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Reaktion wurde mittels HPLC-Analytik verfolgt. In diesem Fall war das Edukt nach 70 Stunden
30 verschwunden.

Die Standardbedingungen der analytischen HPLC sind :

Puffer A : 0,1 molarer Triethylammoniumacetat-Puffer in Wasser

Puffer B : 0,1 molarer Triethylammoniumacetat-Puffer in Wasser:Acetonitril 1:4

Gradient : von 10% B startend auf 50% B in 40 Minuten

Säulenmaterial : 10 μ M LiChrosphere® 100 RP-18 von Merck; 250 x 4

Retentionszeit des Eduktes : 18,8 Minuten

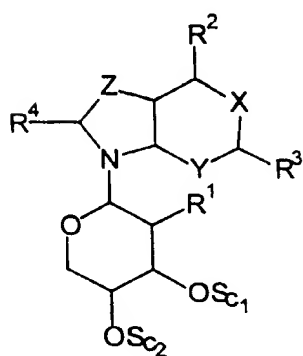
Retentionszeit des Produktes : mehrere Peaks von 13,9-36,2 Minuten

5

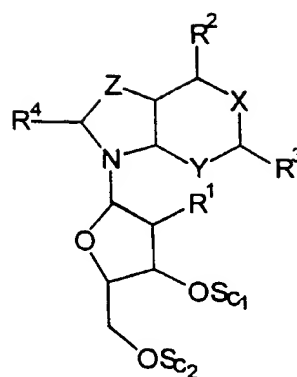
Nach beendeter Reaktion wurde der Ansatz mit Wasser auf das vierfache Volumen verdünnt. Man aktivierte eine Waters Sep-Pak-Kartusche RP-18 (ab 15 OD 2 g Füllung) mit 3 x 10 ml Acetonitril und 3 x 10 ml Wasser, trug das Oligonucleotid auf, ließ einsinken, wusch das Reaktionsgefäß mit 2 x 10 ml Wasser nach, wusch die Kartusche mit 3 x 10 ml Wasser nach, um
10 Salz und überschüssiges Peptid zu entfernen, und eluierte mit 1:1 Wasser : Acetonitril, bis UV-spektroskopisch kein Produkt mehr eluierte. Die Fraktionen wurden in der Kälte und im Dunkeln eingengt, vereinigt, und wieder eingengt.

5 Patentansprüche

1. Linker-Nucleosid der Formel (I) oder (II),



(I)

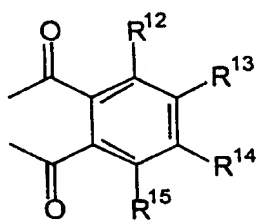


(II)

10

worin

- 15 R^1 gleich H, OH, Hal mit Hal gleich vorzugsweise Br oder Cl,
 R^2 , R^3 und R^4 unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils OC_nH_{2n-1} oder
 $(C_nH_{2n})NR^{10}R^{11}$ mit $R^{10}R^{11}$ verbunden über einen Rest der Formel



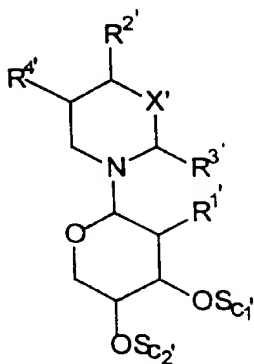
(V),

worin R^{12} , R^{13} , R^{14} und R^{15} unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils H, C_nH_{2n+1} oder C_nH_{2n-1} , mit n gleich eine ganze Zahl von 1-12, vorzugsweise 1-8, insbesondere 1-4, oder OR^7 , wobei R^7 gleich H, C_nH_{2n+1} oder C_nH_{2n-1} , $-C(O)R^8$ mit R^8 gleich ein linearer oder verzweigter, gegebenenfalls substituierter Alkyl-, Aryl-, vorzugsweise Phenyl-Rest,

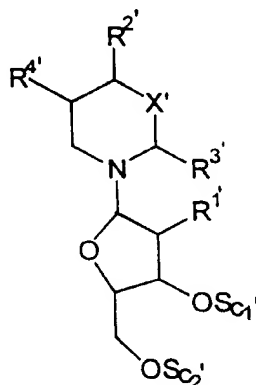
X, Y und Z unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils $=N-$, $=C(R^9)-$ oder $-N(R^9)-$ mit R^9 und R^9 unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils H oder C_nH_{2n+1} oder $(C_nH_{2n})NR^{10}R^{11}$ mit den oben genannten Bedeutungen, bedeutet, und

S_{c1} und S_{c2} unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils H oder eine Schutzgruppe ausgewählt aus einer Acyl-, Trityl- oder Allyloxycarbonylgruppe, vorzugsweise eine Benzoyl- oder 4, 4'-Dimethoxytrityl-(DMT-)gruppe, oder ein Phosphoester(III), Phosphoester(V), Thiophosphat(V), Phosphonat oder Phosphoramidit,

oder der Formel (III) oder (IV)



(III)



(IV)

worin $R^{1'}$ gleich H, OH oder Hal mit Hal gleich vorzugsweise Br oder Cl,

$R^{2'}$, $R^{3'}$ und $R^{4'}$ unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils OC_nH_{2n-1} oder $(C_nH_{2n})NR^{10'}R^{11'}$, wobei $R^{10'}$, $R^{11'}$, unabhängig voneinander die oben genannte Bedeutung von R^{10} bzw. R^{11} hat, und

X' , Y' und Z' unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils $=N-$, $=C(R^9)-$ oder $-N(R^9)-$ bedeutet, wobei R^9 und R^9 unabhängig voneinander die oben genannte

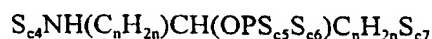
Bedeutung von R^9 bzw. $R^{9'}$ haben, und S_{c1} bzw. S_{c2} die oben genannte Bedeutung von S_{c1} bzw. S_{c2} haben.

2. Linker-Nucleosid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Pentopyranosyl-Nucleosid ein Ribo-, Arabino-, Lyxo- und/oder Xylo-pyranosyl-Nucleosid ist, vorzugsweise ein Ribopyranosyl-Nucleosid.
3. Linker-Nucleosid nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Pentopyranosyl-Teil D- oder L-konfiguriert ist.
4. Linker-Nucleosid nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß als Linker-Nucleosid ein Pentopyranosyl- bzw. Pentofuranosyl-purin, -2,6-diaminopurin, -6-purinthiol, -pyridin, -pyrimidin, -adenosin, -guanosin, -isoguanosin, -6-thioguanosin, -xanthin, -hypoxanthin, -thymidin, -cytosin, -isocytosin, -indol, -tryptamin, -N-phthaloyltryptamin, -uracil, -coffein, -theobromin, -theophyllin, -benzotriazol oder -acridin, eingesetzt wird.
5. Linker-Nucleosid nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß R^2 , R^3 , R^4 , R^2' , R^3' und/oder R^4' ein 2-Phthalimidoethyl- oder Allyloxy-Rest bedeutet.
6. Verfahren zur Herstellung eines Linkers gemäß Formel (III) oder (IV), worin R^4' $(C_nH_{2n})NR^{10'}R^{11'}$ bedeutet und $R^{10'}R^{11'}$ über einen Rest der Formel (V) mit der in Anspruch 1 bezeichneten Bedeutung verbunden ist, dadurch gekennzeichnet, daß
 - (a) eine Verbindung der Formel (II) oder (III) mit R^4' gleich $(C_nH_{2n})OS_{c3}$ oder $(C_nH_{2n})Hal$, worin n die oben genannte Bedeutung hat, S_{c3} eine Schutzgruppe, vorzugsweise eine Mesylat-Gruppe, und Hal Chlor oder Brom bedeutet, mit einem Azid umgesetzt wird,
 - (b) das Reaktionsprodukt aus (a) reduziert wird,
 - (c) das Reaktionsprodukt aus (b) mit einem entsprechenden Phthalimid umgesetzt wird,
 - (d) das Reaktionsprodukt aus (c) mit einer entsprechenden geschützten Pentose umgesetzt wird, und
 - (e) gegebenenfalls die Schutzgruppen abgespalten werden.

7. Verfahren zur Herstellung eines Linkers gemäß Formel (I) oder (II), worin X und Y unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils $=C(R^{16})$ mit R^{16} gleich H oder C_nH_{2n} und Z $=C(R^{16})-$ mit R^{16} gleich $(C_nH_{2n})NR^{10}R^{11}$ mit der in Anspruch 1 bezeichneten Bedeutung, dadurch gekennzeichnet, daß
- 5 (a) das entsprechende Indolin mit einer Pentose zum Nucleosidtriol umgesetzt wird,
(b) die Hydroxylgruppen des Pentose-Teils des Produktes aus (a) vorzugsweise mit Acylgruppen geschützt werden,
(c) das Produkt aus (b) oxidiert wird, und
(d) gegebenenfalls die Hydroxyl-Schutzgruppen des Pentose-Teils des Produktes aus (c)
10 abgespalten werden.
8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß das 4'-geschützte Pentopyranosyl-nucleosid in einem weiteren Schritt phosphoryliert oder an eine feste Phase
15 gebunden wird.
9. Verfahren zur Herstellung einer Nucleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß
(a) in einem ersten Schritt ein geschütztes Nucleosid oder ein geschützter Linker gemäß einem der Ansprüche 1-5 an eine feste Phase gebunden wird und
(b) in einem zweiten Schritt das gemäß Schritt (a) an eine feste Phase gebundene 3'-, 4'-
20 geschützte Nucleosid um ein phosphoryliertes 3'-, 4'-geschütztes Nucleosid bzw. Linker-Nucleosid verlängert wird, anschließend oxidiert wird, und
(c) Schritt (b) solange mit gleichen oder unterschiedlichen Nucleosiden bzw. Linker-Nucleosiden wiederholt wird, bis die gewünschte Nucleinsäure vorliegt, wobei die Nucleinsäure mindestens ein genanntes Linker-Nucleosid enthält.
25
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt (a) und/oder Schritt (b) auch Pentofuranosyl-nucleoside neben Pentopyranosyl-nucleosiden eingebaut werden.
11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß in einem weiteren
30 Schritt (d) die Schutzgruppen und die gebildete Nucleinsäure von der festen Phase abgespalten wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Abspaltung durch Hydrazinolyse vorzugsweise in Gegenwart eines Salzes durchgeführt wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 6-12, dadurch gekennzeichnet, daß in einem weiteren Schritt ein Allyloxy-Linker der Formel

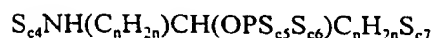


(VI),

worin S_{c4} und S_{c7} unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils eine Schutzgruppe insbesondere ausgewählt aus Fmoc und/oder DMT,

S_{c5} und S_{c6} unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils eine Allyloxy- und/oder Diisopropylamino-Gruppe und n wie in Anspruch 1 bezeichnet, bedeuten, eingebaut wird.

14. Allyloxy-Linker der Formel



(VI),

worin S_{c4} und S_{c7} unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils eine Schutzgruppe insbesondere ausgewählt aus Fmoc und/oder DMT,

S_{c5} und S_{c6} unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils eine Allyloxy- und/oder Diisopropylamino-Gruppe und n wie in Anspruch 1 bezeichnet, bedeuten.

15. Nucleinsäure enthaltend mindestens ein Linker-Nucleosid gemäß einem der Ansprüche 1-5 und gegebenenfalls mindestens einen Allyloxy-Linker gemäß Anspruch 14.

16. Konjugat enthaltend ein Linker-Nucleosid gemäß einem der Ansprüche 1-5, eine Nucleinsäure gemäß Anspruch 15 und/oder ein Biomolekül.
17. Konjugat nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß das Biomolekül ein Peptid,
5 Peptoid, Protein, Zellbestandteil, Filamentbestandteil, oder eine Nucleinsäure, und Derivate davon ist.
18. Träger, dadurch gekennzeichnet, daß daran mindestens ein Linker-Nucleosid gemäß einem der Ansprüche 1-5, mindestens eine Nucleinsäure gemäß Anspruch 15 und/oder
10 mindestens ein Konjugat gemäß Anspruch 16 oder 17 immobilisiert ist.
19. Diagnostikum enthaltend ein Linker-Nucleosid gemäß einem der Ansprüche 1-5, eine Nucleinsäure gemäß Anspruch 15 und/oder ein Konjugat gemäß Anspruch 16 oder 17.
- 15 20. Verwendung eines Linker-Nucleosids gemäß einem der Ansprüche 1-5, einer Nucleinsäure gemäß Anspruch 15, eines Konjugates gemäß Anspruch 16 oder 17 und/oder eines Trägers gemäß Anspruch 18 zur Herstellung eines Arzneimittels, Diagnostikums und/oder elektronischen Bauteils.
- 20 21. Verwendung eines Linker-Nucleosids gemäß einem der Ansprüche 1-5, einer Nucleinsäure gemäß Anspruch 15, eines Konjugates gemäß Anspruch 16 oder 17 und/oder eines Trägers gemäß Anspruch 18 in einem Paarungs- und/oder Testsystem.

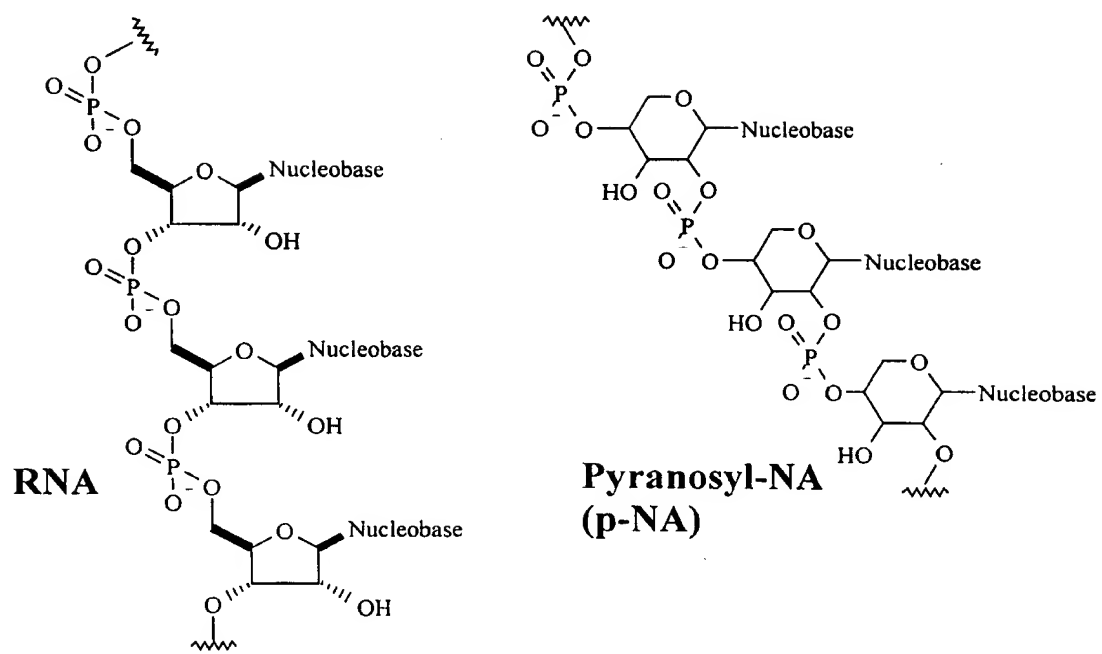
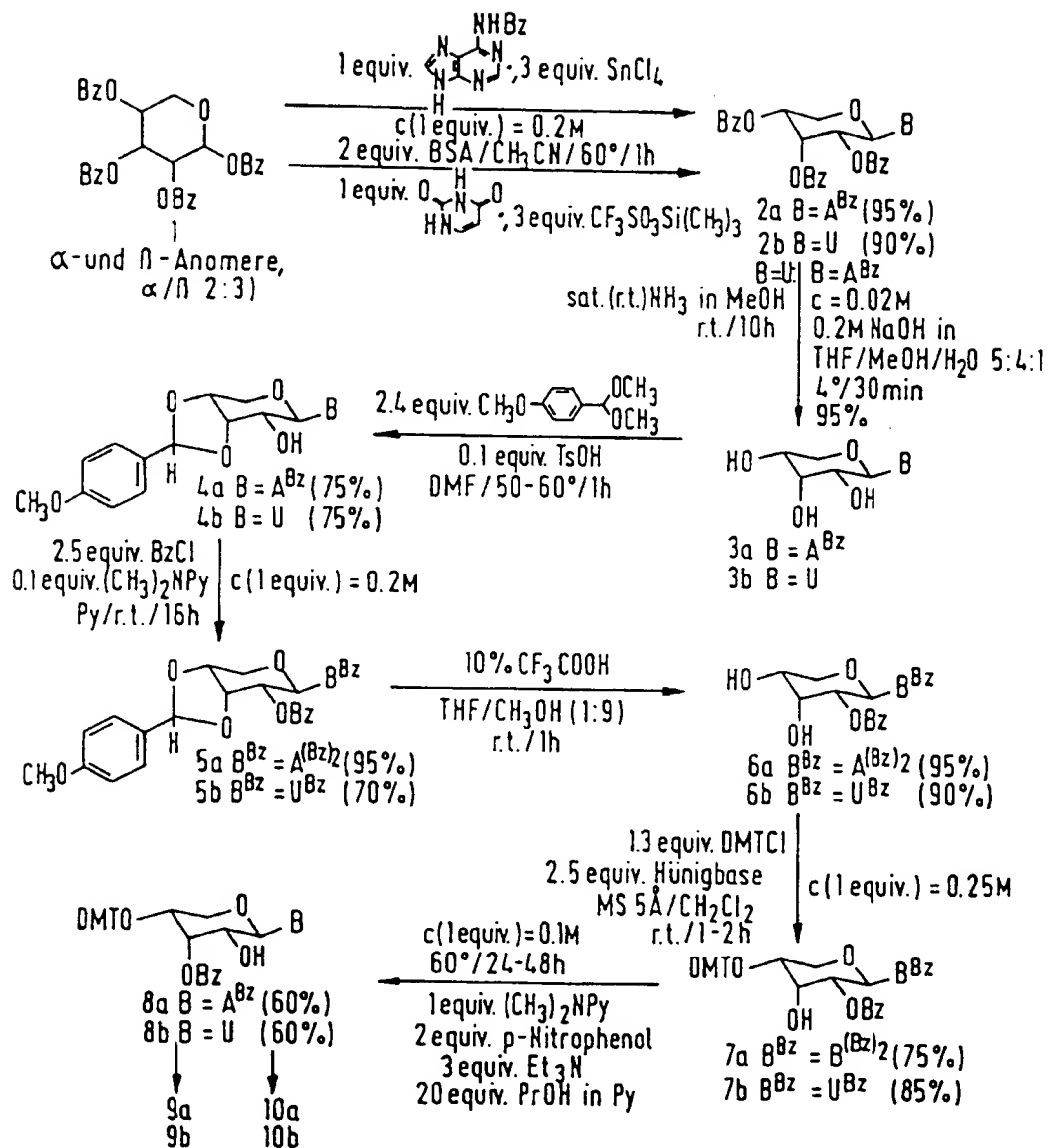


Fig. 1.

Fig. 2A



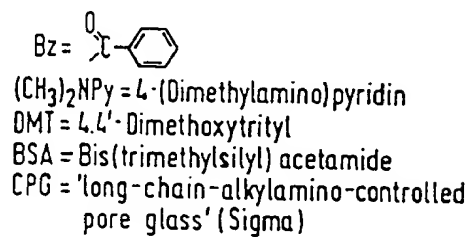
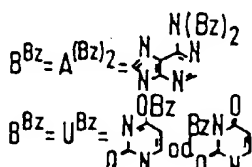
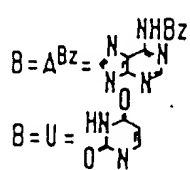
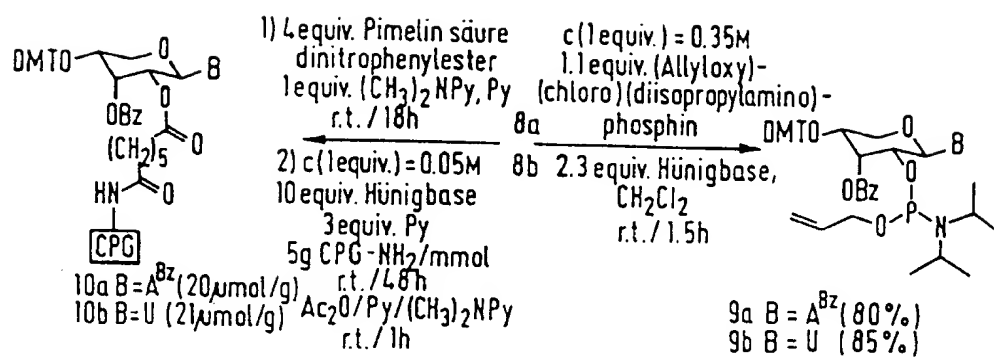


Fig. 2B

5

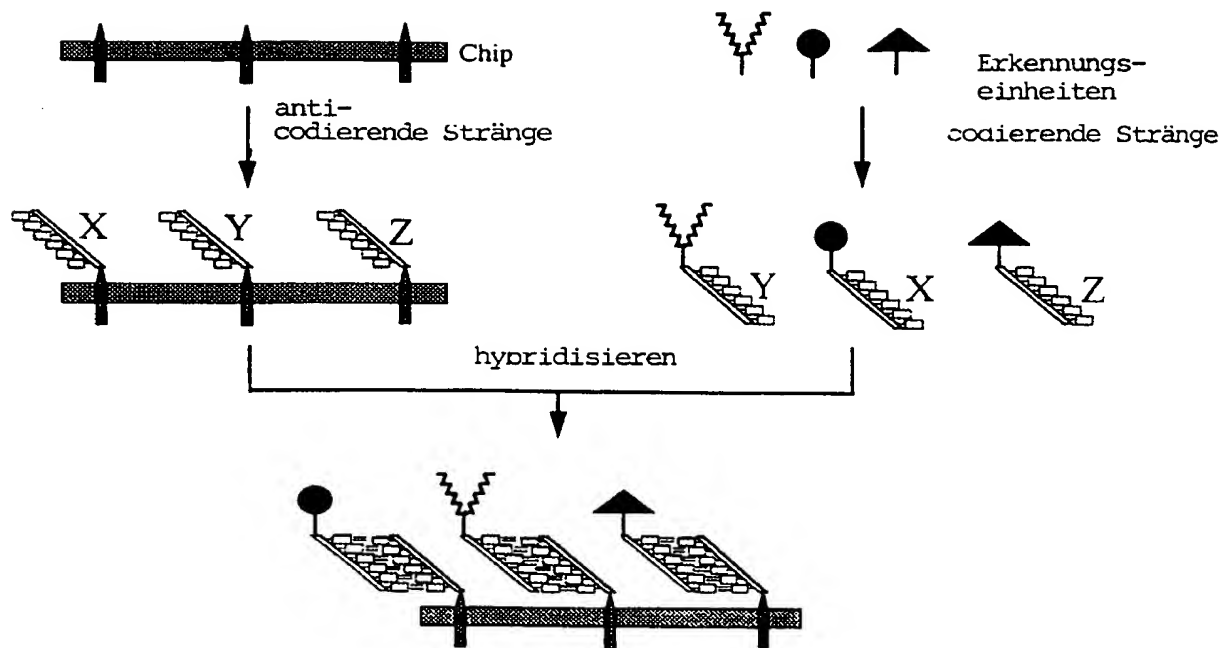


Fig. 3

10